PROTEINCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN AN DEN PROTEINEN L15 UND S1 AUS ESCHERICHIA COLI RIBOSOMEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Sotirios Giorginis
aus
N. Skopos / Serres
(Griechenland)

Berlin 1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544710_0016

PROTEINCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN AN DEN PROTEINEN L15 UND S1 AUS ESCHERICHIA COLI RIBOSOMEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Sotirios Giorginis
aus
N. Skopos / Serres
(Griechenland)

Berlin 1978

Eingereicht am: 17. Mai 1978

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juni 1978

1. Gutachter: Professor Dr. H.G. Wittmann

2. Gutachter: Ass.-Prof.Dr. H. Ristow

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Ribosomen - Topographie	2
1.2.	Ribosomen - Funktion	7
2.	Problemstellung	12
2.1.	Das ribosomale Protein L15	12
2.2.	Das ribosomale Protein S1	13
3.	Material und Methoden	14
3.1.	Sequenzierung des ribosomalen Proteins L15	14
3.1.1.	Enzymatische Spaltungen	14
3.1.1.1.	Spaltung mit Trypsin	14
3.1.1.2.	Spaltung mit Staphylococcus aureus Protease	15
3.1.1.3.	Spaltung mit α- Chymotrypsin	15
3.1.1.4.	Spaltung mit Thermolysin	16
3.1.1.5.	Spaltung mit Trypsin nach Blockierung der Lysin - Reste mit Citraconsäure anhydrid	16
3.1.2.	Trennung der Peptide	18
3.1.2.1.	Trennung auf Dünnschicht - Celluloseplatten	18
3.1.2.1.1.	Peptidkartentechnik	18
3.1.2.1.2.	Dünnschichtchromatographie	20
3.1.2.2.	Trennung durch Gelfiltration	20
3.1.2.2.1.	Sephadex - Säulengelfiltration	20
3.1.3.	Aminosäureanalysen	21
3.1.3.1.	Nachweis und quantitative Bestimmung von Cystein - Resten in Proteinen	21
3.1.3.2.	Nachweis von Tryptophan - Resten mit Ehrlich Reagenz	22
3.1.4.	Sequenzanalysen	22
3.1.4.1.	Edman - Abbau	22
3.1.4.2.	Manuelle Sequenzierung der Peptide mit der Mikro - Dansyl - Edman - Methode	23
3.1.4.2.1.	Manueller Edman - Abbau	23
3.1.4.2.2.	Dansylierung	24
3.1.4.2.3.	Chromatographie der DNS - Aminosäuren	26

3.1.4.2.4.	Isomerisierung der Thiazolinon - Derivate in PTH - Aminosäuren (Konvertierung)	29
3.1.4.2.5.	Chromatographie der PTH - Aminosäuren	29
3.1.4.2.6.	Rückspaltung der Thiazolinon - Derivate	30
3.2.	Isolierung des ribosomalen Proteins S1, Fragmentierung dieses Proteins mit BrCN, Isolierung und Charakterisierung von BrCN - Fragmenten	31
3.2.1.	Isolierung des ribosomalen Proteins S1	31
3.2.1.1.	Bakterienzüchtung	31
3.2.1.2.	Isolierung von Ribosomen	31
3.2.1.3.	Reinigung des ribosomalen Proteins S1	33
3.2.1.3.1.	Waschen der Ribosomen mit Äthanol	33
3.2.1.3.2.	Extraktion der ribosomalen Proteine mit 4M LiCl / 8M Harnstoff	34
3.2.1.3.3.	Trennung der basischen von den sauren ribosomalen Proteinen am Ionenaustauscher	34
3.2.1.3.4.	Abtrennung der sauren hochmolekularen von den sauren niedermolekularen Proteinen durch Gelfiltration	35
3.2.1.3.5.	Trennung der hochmolekularen sauren ribosomalen Proteine am Ionenaustauscher	35
3.2.1.3.6.	Quantitative Proteinbestimmung	36
3.2.1.3.7.	Identifizierung der eluierten Proteine	36
3.2.1.3.8.	Oberprüfung der Identität und Reinheit von isolierten Proteinen	37
3.2.1.3.9.	Weitere Reinigung des isolierten S1 durch Gelfiltration	38
3.2.2.	Fragmentierung des ribosomalen Proteins S1 mit BrCN	39
3.2.3.	Isolierung von BrCN - Fragmenten durch Gelfiltration	
3.2.4.	Charakterisierung von isolierten BrCN - Fragmenten	41
3.2.4.1.	Molekulargewichtsbestimmung von isolierten BrCN - Fragmenten durch SDS - Polyakrylamidgel - Elektrophorese	41

4. Ergebnisse

4.1. Primärstruktur des ribosomalen Proteins L15 42

4.1.1. Nachweis und quantitative Bestimmung von Cysteinresten 42

4.1.2. Spaltung des Proteins L15 mit Trypsin 42

4.1.2.1. Prüfung auf Tryptophanreste 42

4.1.2.2. Isolierung der tryptischen Peptide 42

4.1.2.3. Sequenzierung der aus der tryptischen Spaltung des Proteins L15 gewonnenen Peptide 45

4.1.3. Spaltung des Proteins L15 mit Staphylococcus aureus Protease (SP - Peptide) 50

4.1.3.1. Isolierung der SP - Peptide 50

4.1.3.2. Spaltung von SP - Peptiden mit Trypsin 53

4.1.3.2.1. Isolierung der Peptide aus der tryptischen Spaltung von SP 3 53

4.1.3.2.2. Isolierung der Peptide aus der tryptischen Spaltung des Peptids SP 7 56

4.1.3.2.3. Sequenzierung der aus der tryptischen Spaltung von SP 3 und SP 7 gewonnenen Peptide 58

4.1.3.3. Sequenzierung von SP - Peptiden 59

4.1.3.4. Spaltung von SP - Peptiden mit α- Chymotrypsin 61

4.1.3.4.1. Isolierung der Peptide aus der chymotryptischen Spaltung von SP 3 61

4.1.3.4.2. Isolierung der Peptide aus der Spaltung von SP 5 mit α- Chymotrypsin 65

4.1.3.4.3. Sequenzierung der aus der chymotryptischen Spaltung von SP 3 und SP 5 gewonnenen Peptide 65

4.1.3.5. Spaltung von SP - Peptiden mit Thermolysin 66

4.1.3.5.1. Isolierung der Peptide aus der thermolytischen Spaltung von SP 3 66

4.1.3.5.2. Sequenzierung von Peptiden, die nach der thermolytischen Spaltung von SP 3 gewonnen wurden 69

4.1.4. Tryptische Spaltung des Proteins nach Lysin - Blockierung mit Citraconsäureanhydrid 70

4.1.4.1. Isolierung der lysin - blockierten tryptischen Peptide 71

4.1.4.2.	Sequenzierung der lysin - blockierten tryptischen Peptide	77
4.1.4.3.	Spaltung von LBT10 mit Trypsin	79
4.1.4.3.1.	Isolierung der nach der tryptischen Spaltung von LBT 10 entstandenen Peptide	79
4.1.4.3.2.	Sequenzierung von LBTT - Peptiden	79
4.1.5.	Homologe Regionen	85
4.1.6.	Aussagen über die Sekundärstruktur von L15.	86
4.2.	Isolierung des ribosomalen Proteins S1 , Fragmentierung dieses Proteins mit BrCN sowie Isolierung und Charakterisierung von BrCN - Fragmenten	88
4.2.1.	Isolierung des ribosomalen Proteins S1	88
4.2.1.1.	Erste Präparation des Proteins S1	88
4.2.1.2.	Zweite Päparation des Proteins S1	95
4.2.2.	Fragmentierung des Proteins S1 mit BrCN	98
4.2.3.	Isolierung von BrCNF1 durch Gelfiltration	99
4.2.4.	Charakterisierung von BrCNF1	100
4.2.4.1.	Homogenitätsprüfung an BrCNF1	101
5.	Diskussion	102
5.1.	Sequenzierung des ribosomalen Proteins L15	102
6.	Zusammenfassung	104
6.1.	Aufklärung der Primärstruktur von L15	104
6.2.	Isolierung des ribosomalen Proteins S1, Spaltung dieses Proteins mit BrCN sowieIsolierung und Charakterisierung von BrCN - Fragmenten	105
7.	Literaturverzeichnis	106
8.	Anmerkungen	110

1. Einleitung

Proteine sind neben den Nukleinsäuren Hauptbestandteile aller Organismen, von Bakterien bis zum Menschen. Sie sind Makromoleküle in der Form einer Kette mit einigen hundert Kettengliedern, den Aminosäuren. Die Reihenfolge der nur 20 verschiedenen Aminosäuren, die in den Proteinen vorkommen, ist für jedes Protein charakteristisch, und durch das genetische Material, die Desoxyribonukleinsäure (DNS) genau festgelegt. Die Proteine sind sowohl Strukturelemente der Zelle, als auch Funktionseinheiten, die fast alle Lebensvorgänge regulieren.

Die Proteinsynthese findet an den Ribosomen statt, kleinen Zellorganellen, die in allen Organismen vorkommen. In Parkaryonten sind die Ribosomen etwas kleiner (Sedimentationskoeffizient 70S) als die im Cytoplasma eukaryontischer Zellen (80S). Ribosomen von Chloroplasten und Mitochondrien sind annähernd gleich groß wie prokaryontische Ribosomen. Alle Ribosomen bestehen aus zwei Untereinheiten unterschiedlicher Größe: die Untereinheiten der 80S Ribosomen sedimentieren mit 40S und 60S, die der 70S Ribosomen mit 30S und 50S. Die Bausteine aller Ribosomen sind Proteine und Ribonukleinsäure-Moleküle (RNS-Moleküle). Die kleine ribosomale Untereinheit (30S) von E. coli, dem am besten untersuchten Organismus, besteht aus 21 Proteinen, die S1-S21 genannt werden, und einem RNS-Molekül (16S) (ungefähr 1600 Nukleotide), während sich die große Untereinheit (50S) aus 34 Proteinen (L1-L34) und zwei RNS-Molekülen (23S) mit ungefähr 3200 Nukleotiden und (5S) mit 120 Nukleotiden zusammensetzt.

1.1. Ribosomen-Topographie

Erkenntnisse über die räumliche Anordnung der zahlreichen ribosomalen Komponenten in den Untereinheiten ergaben sich aus folgenden kurz dargestellten, chemischen, physikalischen und immunologischen Methoden:

a) Verknüpfung zwischen Proteinen
Durch kovalente Bindung bifunktioneller Reagenzien an zwei benachbarten Proteinen im Ribosom entstehen Proteinpaare, die man isolieren kann, und deren Proteine man mit immunologischen oder elektrophoretischen Methoden identifizieren kann.

b) Verknüpfung zwischen RNS und Proteinen
Durch Behandlung der Ribosomen bzw. deren Untereinheiten mit anderen bifunktionellen Reagenzien gewinnt man nach der Proteinextraktion Komplexe, die aus einem Protein und dem benachbarten RNS-Stück bestehen. Durch die Nukleotid-Sequenzbestimmung dieses RNS-Stückes, bezogen auf die bekannte Sequenz des entsprechenden ribosomalen RNS-Moleküls, läßt sich ermitteln, welche Region des RNS-Moleküls im Ribosom in der Nähe des betreffenden Proteins liegt.

c) Fragmentierung
Durch sehr schwache Behandlung der kleinen Ribosomen-Untereinheiten mit einer Nuklease wird die 16S RNS nur an solchen Stellen gespalten, die für das Enzym zugänglich sind. Die erhaltenen Fragmente, die aus mehreren Proteinen und einem Stück der 16S RNS bestehen, sind durch Gelelektrophorese oder Gradientenzentrifugation isolierbar. Durch Identifizierung der an den Fragmenten beteiligten Proteine und durch Nukleotid-Sequenzbestimmung der entsprechenden RNS-Stücke lassen sich Informationen über die Nachbarschaft zwischen Proteinen und RNS-Regionen in den Ribosomen gewinnen.

d) Bindungsstellen

Etwa ein Drittel der ribosomalen Proteine binden spezifisch und unabhängig voneinander an die ribosomalen Nukleinsäuren (5S, 16S bzw. 23S RNS). Diese RNS-Regionen sind durch die Proteine gegen den Abbau mit Nukleasen geschützt und lassen sich als RNS-Protein-Komplexe isolieren. Durch Nukleotid-Sequenzbestimmung der RNS-Stücke in den Komplexen läßt sich bestimmen, an welcher RNS-Region das untersuchte Protein gebunden war.

e) Rekonstitution

Sowohl die 30S Untereinheit als auch die 50S Untereinheit können in vitro in die einzelnen Proteine und Ribonukleinsäuren zerlegt und wieder zu voll aktiven Partikelchen rekonstituiert werden. Die Rekonstitution ist eine brauchbare Methode zur Aufklärung der Funktion der ribosomalen Komponenten. Durch Weglassen einzelner Komponenten kann man aus der Auswirkung auf die Proteinbiosynthese auf die Funktion der weggelassenen Komponente schliessen. Da aber während des Rekonstitutionsprozesses bestimmte Proteine erst dann an das entstehende Partikelchen binden können, wenn andere Proteine bereits vorhanden sind, kann die Untersuchung der Zwischenschritte während der Rekonstitution Informationen über die Topographie des Ribosoms geben.

f) Fluoreszenz-Markierung

Aus den Untereinheiten werden einzelne Proteine isoliert. Zwei von ihnen werden mit verschiedenen Fluoreszenz-Substanzen markiert, und dann werden die Untereinheiten in Gegenwart der restlichen nicht-markierten Komponenten rekonstituiert. Durch Messungen des Energietransfers in einem Spektrofluorometer kann der Abstand zwischen den beiden markierten Proteinen bestimmt werden.

g) Neutronenbeugung

Aus E. coli Bakterien, die im schweren Wasser und unter Zusatz von deuterierten Nährstoffen wachsen, und dadurch alle Zellbestandteile in der deuterierten Form (D-Form) enthalten, isoliert man zunächst die Ribosomen und dann die ribosomalen Proteine. Aus zwei Proteinen in der D-Form und aus allen restlichen ribosomalen Komponenten in der normalen H-Form werden die Untereinheiten rekonstituiert. Daneben benötigt man auch die entsprechenden Untereinheiten, in denen jeweils nur das eine der beiden Proteine deuteriert ist. Durch Messung der Neutronenbeugung läßt sich der Abstand zwischen den beiden deuterierten Proteinen bestimmen. Mit dieser Methode ist es außerdem möglich, Informationen über die Form der Untereinheiten sowie über die Verteilung von Proteinen und RNS in den Ribosomen zu erhalten.

h) Proteine an der Oberfläche

Die an der Oberfläche der Untereinheiten befindlichen Proteine bzw. deren Teile, lassen sich durch chemische oder immunologische Methoden erkennen. Bei den chemischen Methoden werden Reagenzien verwendet, die wegen ihrer Größe nicht in das Ribosomen-Innere eindringen können (z.B. Isothiocyanate, die an hochmolekulare Träger gebunden sind.) Eine Reaktion zwischen Antikörper und dem entsprechenden Protein im Ribosom ist nur dann möglich, wenn das Protein zumindest mit einem Teil der Proteinkette, der eine antigene Determinante enthält, an der Ribosomenoberfläche liegt.

i) Immun-Elektronenmikroskopie

Eine Kombination von immunologischen und elektronenmikroskpischen Methoden ermöglicht das Erkennen von "Dimeren"; d.h. zwei ribosomale Untereinheiten sind durch einen bivalenten Antikörper verbunden. Weil beide Untereinheiten eine charakteristische Gestalt haben, kann man durch diese Methode die Bindungsstellen der proteinspezifischen Antikörper auf dem Ribosom lokalisieren.

Das ist für alle 21 Proteine in der kleinen Untereinheit und für etwa 60% der 34 Proteine in der großen Untereinheit geschehen. Aus diesen Daten wurde sowohl das Modell der 30S Untereinheit mit den Bindungsstellen für die Antikörper gegen die verschiedenen ribosomalen Proteine (Abb.1) als auch das Modell des 70S Ribosoms (Abb.2) aufgestellt.

Abb. 1: Modell der 30S Untereinheit mit den Bindungsstellen für Antikörper gegen die verschiedenen ribosomalen Proteine (Tischendorf et al 1975)

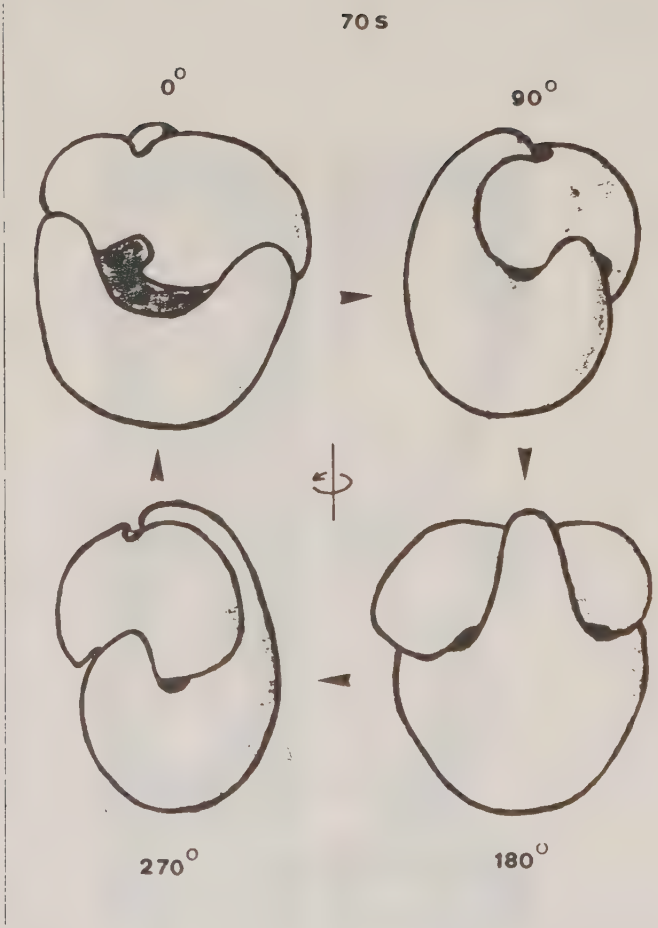


Abb. 2: Modell des 70S Ribosoms (Tischendorf et al 1975)

1.2. Ribosomen-Funktion

Es ist bereits erwähnt worden, daß die Reihenfolge der Aminosäuren in einer Proteinkette durch das genetische Material, die DNS, genau festgelegt ist. Die Übertragung der genetischen Information von der DNS zu den Orten der Proteinsynthese, den Ribosomen, erfolgt durch die Boten-Ribonukleinsäuren (Boten-RNS). Auf Grund der Boten-RNS-Moleküle, die den Ribosomen als Bauplan für die Reihenfolge der verschiedenen Aminosäuren der jeweils zu synthetisierenden Proteinkette dienen, und unter Beteiligung von vielen anderen Molekülen, können die Ribosomen ihre Aufgabe, Proteine zu synthetisieren, erfüllen. Das geschieht in einem komplizierten Ablauf verschiedener Einzelvorgänge (Abb.3), die man in drei Hauptphasen einteilen kann: Initiation (Synthese-Start), Elongation (fortlaufende Synthese), Termination (Synthese-Stop).

I n i t i a t i o n

Der erste Initiationsschritt ist die Bindung des Initiationsfaktors IF-3 an die 30S-Untereinheit. Dadurch wird eine Reassoziation der 30S und 50S-Untereinheiten verhindert. Beim nächsten Schritt binden an die 30S-Untereinheit die Boten-RNS oder Messenger-RNS (mRNS) und die sogenannte Initiator-Transfer-RNS, d.h. eine Transfer-RNS (tRNS), die mit Formylmethionin beladen ist (fMet-tRNS). Diese Reaktion benötigt zwei weitere Initiationsfaktoren (IF-1 und IF-2) sowie GTP. Die Frage, ob zuerst die mRNS oder die fMet-tRNS an die 30S-Untereinheit bindet, ist zur Zeit noch strittig. Die über das Startcodon AUG an die mRNS gebundene fMet-tRNS sitzt in einer der beiden ribosomalen tRNS-Bindungsstellen, der sogenannten Donor-oder Peptidyl-Stelle (P-Stelle). Nach Dissoziation des Initiationsfaktors IF-3 liegt der sog. 30S-Initiationskomplex vor, der dann durch Anlagerung an die 50S Untereinheit bei gleichzeitiger Freisetzung des Initiationsfaktors IF-1 in den 70S-Initiationskomplex übergeht. Es erfolgt Dis-

soziation des Initiationsfaktors IF-2 unter Abspaltung des GTP in GDP und Pi, und anschließend beginnt die Elongation.

E l o n g a t i o n

Ein ternärer Komplex aus dem Elongationsfaktor EF-Tu, einem GTP-Molekül und einer Aminoacyl-tRNS bindet an die zweite ribosomale tRNS-Bindungsstelle, die Akzeptorstelle (A-Stelle). Es kann nur derjenige ternäre Komplex gebunden werden, dessen Aminoacyl-tRNS zu dem in der A-Region befindlichen Codon auf der mRNS paßt. Dann wird das GTP in GDP und Pi gespalten und ein Komplex aus EF-Tu und GDP sowie Pi verlassen das Ribosom. In diesem Zustand befinden sich die beiden Aminosäuren der P-und A-Region im Bereich der in der 50S Untereinheit lokalisierten Peptidyltransferase, mit deren Hilfe die Peptidbindung zwischen dem Carboxylende der ersten Aminosäure (fMet) und dem Aminoende der zweiten Aminosäure hergestellt wird. Das dadurch entstandene Dipeptid hängt an der tRNS, die sich noch in der A-Stelle befindet, während die an der P-Stelle befindliche unbeladene tRNS das Ribosom verläßt. Die P-Stelle wird dabei frei. Unter Mitwirkung des Elongationsfaktors EF-G und durch GTP-Spaltung in GDP und Pi wird die mit dem wachsenden Peptid beladene tRNS zusammen mit dem dazugehörigen Codon auf der mRNS von der A-Stelle in die P-Stelle transportiert, (Translokation), wobei ein neues Codon auf der mRNS in der A-Region auftritt. Damit ist die A-Stelle wieder frei, und ein neuer ternärer Komplex aus EF-Tu, GTP und Aminoacyl-tRNS kann daran binden. Nachdem dies geschehen ist, beginnt ein neuer Elongationszyklus, nach dessen Ablauf aus dem Di-ein Tripeptid geworden ist. Der Elongationszyklus wird solange wiederholt, bis ein Nonsense-oder Stopcodon (UAA,UGA,UAG) auf der mRNS in der A-Region auftritt. Zu diesen Codonen paßt keine Aminoacyl-tRNS, und die Elongation ist zu Ende.

T e r m i n a t i o n

Das Freisetzen der neu synthetisierten Polypeptidkette von der an der P-Stelle des Ribosoms befindlichen tRNS, an der sie noch hängt, ist die Aufgabe des Terminationsschrittes. Das geschieht unter Beteiligung von drei Entlassungsfaktoren (Release-Faktoren) RF-1, RF-2 und RF-3, von denen RF-1 für die Terminationscodonen UAA und UAG und RF-2 für UAA und UGA spezifisch sind. Das befreite, von der tRNS neu synthetisierte Protein, die tRNS und die mRNS verlassen das Ribosom, das in seine beiden Untereinheiten zerfällt. Diese können dann weiter in die Initiationsphase wandern, und damit die Synthese eines neuen Proteins starten.

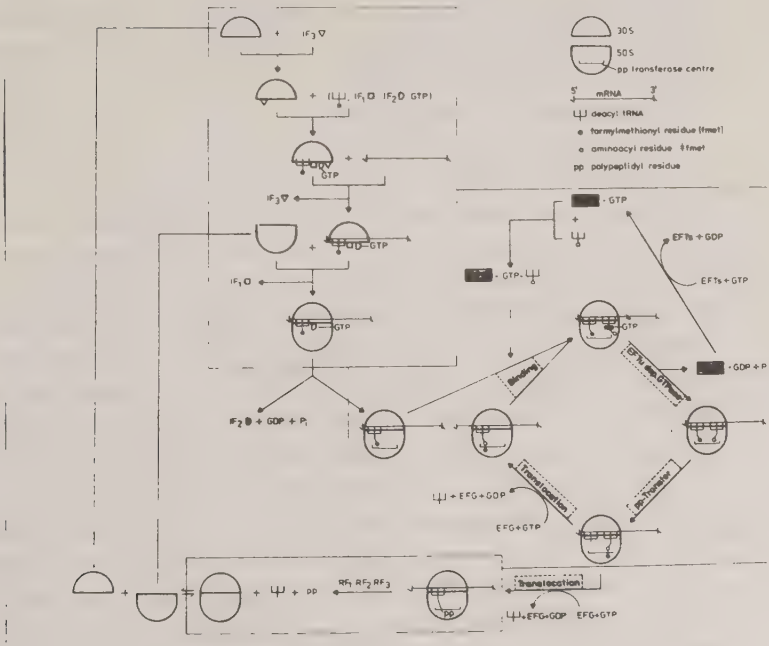


Abb. 3: Schematische Darstellung der Translation (nach Weber und Kierhaus, 1972)

Funktion der ribosomalen Komponenten

Informationen über die Beteiligung der zahlreichen ribosomalen Komponenten an dem in Abbildung 3 dargestellten Mechanismus der Proteinbiosynthese lassen sich durch folgende Methoden erhalten:

a) Affinitätsmarkierung

Mit dieser Methode kann man die Bindungsstellen für verschiedene Antibiotika, die tRNS und mRNS auf dem Ribosom lokalisieren. Dabei werden diese Substanzen radioaktiv gemacht und chemisch so modifiziert, daß sie kovalent an das Ribosom binden. Eine Prüfung auf die Spezifität der Bindung, d.h. ob diese in der selben Weise und an dem selben Ort erfolgt, ist unbedingt notwendig. Anschließend wird das Ribosom zerlegt, und ein Komplex aus der radioaktiven Substanz und derjenigen Komponente, die reagiert hat, wird isoliert. Durch elektrophoretische und immunologische Methoden kann man die betreffende ribosomale Komponente identifizieren.

b) Partielle Rekonstitution

Unter bestimmten Bedingungen, z.B. durch steigende Konzentration an LiCl, kann man stufenweise aus der großen Untereinheit Proteine abspalten, wobei jeweils "core-Partikel" mit immer weniger Proteinen übrigbleiben. Durch Testen der verschiedenen "Cores" auf bestimmte ribosomale Teilfunktionen bestimmt man diejenigen "Cores", bei denen die betreffende Funktion verloren gegangen ist. Setzt man zu diesen inaktiven "Cores" das Proteingemisch, das man zu deren Entstehung vorher abgespalten hat, wieder hinzu, so erhält man Partikelchen, die wieder aktiv sind. Um herauszufinden, welches Protein von diesem Gemisch für die Aktivität notwendig ist, werden die voneinander getrennten Proteine dieses Gemisches einzeln zu den inaktiven "Cores" hinzugesetzt. Der Zusatz eines bestimmten Proteins (und nicht jedes) stimuliert die Aktivität. Auf diese Weise läßt sich eine bestimmte Teilfunktion einem bestimmten ribosomalen Protein zuordnen.

c) Totale Rekonstitution

Wie bereits erwähnt, kann man bei dieser Methode durch Weglassen jeweils eines ribosomalen Proteins während der Rekonstitution bzw. durch chemische Modifikation eines Proteins Aussagen über die Funktion des betreffenden Proteins erhalten. Durch diese Methode konnte auch erstmals nachgewiesen werden, daß ein bestimmtes Protein, das in Ribosomen aus gegen ein bestimmtes Antibiotikum resistenten Mutanten verändert war, auch wirklich die Resistenz bewirkte. Das war das Protein S5 bei Resistenz gegen Spectinomycin und das Protein S12 bei Resistenz gegen Streptomycin.

d) Hemmung durch Antikörper

Bei dieser Methode werden Antikörper, die gegen isolierte Einzelproteine des Ribosoms gerichtet sind, zu Funktionstesten hinzugesetzt. Wenn das betreffende Protein an einer ribosomalen Teilfunktion beteiligt ist, kommt es zur Hemmung dieser Funktion. Daraus ergibt sich eine Zuordnung von ribosomalen Proteinen zu bestimmten Teilfunktionen.

2. Problemstellung

Primäre Aufgabe meiner Doktorarbeit war die Aufklärung der Primärstruktur des ribosomalen Proteins L15. Daran schloß sich als weitere Aufgabe an: Isolierung des ribosomalen Proteins S1, Fragmentierung dieses Proteins mit BrCN sowie Isolierung und Charakterisierung von BrCN-Fragmenten.

2.1. Das ribosomale Protein L15

L15 ist ein basisches Protein aus der großen ribosomalen Untereinheit. Durch Affinitätsmarkierungen mit P-Nitrophenylcarbamylphenylalanyl-tRNS als Peptidyl-tRNS-Analogon (Czernilofsky et al, 1974) wurde festgestellt, daß es an oder in der Nähe der sogenannten Donor- oder Peptidyl-tRNS- Bindungsstelle des Peptidyltransferasezentrums lokalisiert ist. Eine spezifische Bindung des L15 an die 23S ribosomale RNS (23S rRNS) konnte nachgewiesen werden, (Littlechild et al, 1977), wenn das Protein unter Bedingungen isoliert wurde, die eine Denaturierung möglichst vermieden. In Experimenten mit dem Antibiotikum Erythromycin (Teraoka und Nierhaus, 1977) wurde gefunden, daß das Antibiotikum, im Gegensatz zu allen anderen ribosomalen Komponenten, an das isolierte Protein L15 bindet, und daß die Bindung von Erythromycin an das Ribosom absolut abhängig von der Gegenwart dieses Proteins ist.

Voraussetzung für ein tieferes Verständnis der oben erwähnten experimentellen Ergebnisse ist die Kenntnis der Primärstruktur dieses Proteins. Die Aufklärung der Aminosäuresequenz von L15 wird in der vorliegenden Arbeit ausführlich beschrieben.

2.2. Das ribosomale Protein S1

S1 ist ein relativ saures Protein aus der 30S Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 68,000 (Giri und Subramanian, 1977). Es ist das längste prokaryontische ribosomale Protein überhaupt. In Vernetzungsexperimenten mit Perjodat (Kenner, 1973; Czernilovsky et al, 1975) wurde gefunden, daß S1 in der Nähe des 3'Endes der 16S rRNS liegt. Weiterführende Experimente von Dahlberg und Dahlberg (1975) zeigten, daß S1 an das 3'terminale Dodecamer der 16S rRNS bindet. Außerdem wurde über die Bindung von S1 an eine bestimmte Sequenz der 23S rRNS, an die das ribosomale Protein L1 bindet, berichtet. (Krol et al, 1977)

Durch in vitro Proteinsyntheseexperimente, bei denen als natürliche mRNS RNS aus dem Bakteriophagen MS2 und 30S Untereinheiten ohne S1 (30S minus S1) benutzt wurden, wurde gezeigt, daß S1 für die Translation der MS2 RNS notwendig ist (van Dieijen et al, 1974). Weitere Experimente, bei denen sowohl 70S minus S1 Ribosomen als auch mit Antikörper gegen S1 behandelte 70S Ribosomen benutzt wurden, zeigten, daß S1 für die Bildung des Initiationskomplexes mit MS2 RNS, nicht aber für die Bindung der fMet-tRNS an das Ribosom in Gegenwart des Triplets AUG notwendig ist (van Dieijen et al, 1976). Ferner zeigten Szer et al (1975), daß nur 30S und nicht 30S minus S1 Untereinheiten einen Initiationskomplex mit MS2 RNS bilden, während beide gleich aktiv an der Bindung der fMet-tRNS in Gegenwart von AUG sind. Zu dem gleichen Ergebnis kamen auch Sobura et al (1977) im Falle der R17 RNS. Aus den geschilderten Untersuchungen geht die Wichtigkeit dieses Proteins für die Proteinbiosynthese mit natürlicher mRNS hervor.

3. Material und Methoden

3.1. Sequenzierung des ribosomalen Proteins L15

Das Protein L15 wurde nach der Methode von Hindenach, Kaltschmidt und Wittmann (1971) isoliert und von Dr. H.G. Wittmann zur Verfügung gestellt.

3.1.1. Enzymatische Spaltungen

Das Enzym/Substrat-Mengenverhältnis betrug bei den Ansätzen aller enzymatischer Spaltungen 1:50. Die Konzentration (1 mg/ 0,5 ml) des (in dem entsprechenden Puffer gelösten) Substrates blieb konstant. Ausnahmen davon waren nur die Ansätze der tryptischen Spaltung nach Blockierung der Lysin-Reste mit Citraconsäureanhydrid und mancher analytischer Spaltungen.

3.1.1.1. Spaltung mit Trypsin

Trypsin spaltet Proteine und Peptide spezifisch am Carboxylende der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin. Für alle Spaltungen wurde Enzym benutzt, das zur Beseitigung einer chymotryptischen Nebenaktivität mit 1-Chlor-4-Phenyl-3-Tosylamino-2-Butanon (TPCK) behandelt war (Merck, Darmstadt). Für präparative Spaltungen wurde 1.5 mg Protein in 0.75 ml 0.2 M N-Methylmorpholin Puffer pH 8.1 gelöst und es wurden 30 µl aus einer frisch angesetzten wasserigen Enzymlösung (1 mg/ml) zugegeben. Der Ansatz wurde im Wasserbad bei 37°C während 4 Stunden inkubiert und anschliessend nach Zugabe von 1.5 ml H_2O bidest eingefroren und lyophilisiert. Nach dem gleichen Prinzip wurden auch nachzuspaltende Peptide behandelt.

Für analytische Zwecke, wie z.B: Anfertigung von Peptidkarten, wurden etwa 10 nmol Protein bzw. nachzuspaltendes Peptid in 80 µl 0.2 M N-Methylmorpholin Puffer,

pH 8.1, gelöst und auf gleiche Weise gespalten

3.1.1.2. Spaltung mit Staphylococcus aureus Protease

Proteine und Peptide werden von der Protease aus Staphylococcus aureus spezifisch am Carboxylende von Glutaminosäuren gespalten (Houmard und Drapeau, 1972). Die optimalen Spaltbedingungen liegen bei pH 4,0 oder pH 7,8 und 37°C.

Das Enzym wurde von Miles Laboratories Ltd Stoke Doges, England geliefert. Für präparative Spaltungen wurde 6 mg Protein in 3 ml 0.05 M NH_4-acetat-Puffer, pH 4, gelöst. Nach Zugabe von 120 µl aus einer frisch angesetzten Enzymlösung (1 mg/ml) erfolgte die Spaltung im Wasserbad bei 37°C während 16 Stunden. Nach Zugabe von 3 ml H_2O bidest wurde die Probe eingefroren, lyophilisiert, nochmals in 3 ml H_2O bidest aufgenommen und gefriergetrocknet. Für analytische Zwecke wurde etwa 10 nmol Protein in 80 µl 0.05 M NH_4-acetat-Puffer, pH 4, gelöst und nach dem gleichen Prinzip gespalten.

3.1.1.3. Spaltung mit α-Chymotrypsin

α-Chymotrypsin spaltet Proteine und Peptide vorzugsweise am Carboxylende von Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan und Leucin. Ferner sind Spaltungen am Carboxylende von Methionin, Glutamin, Asparagin, Histidin und Threonin möglich.
Für präparative Spaltungen wurde etwa 0.5 mg nachzuspaltendes Peptid in 0.25 ml 0.2 M N-Methylmorpholin Puffer, pH 8.1, gelöst. Nach Zugabe von 10 µl aus einer frisch angesetzten α-Chymotrypsin-Lösung (1 mg/ml) wurde der Ansatz im Wasserbad bei 37°C während 30 Minuten inkubiert. Nach anschließender Zugabe von 0.5 ml H_2O bidest wurde die Probe eingefroren und lyophilisiert.

Für analytische Zwecke Zwecke wurden 10 nmol Protein bzw. nachzuspaltendes Peptid in 80 µl 0.2 M N-Methylmorpholin Puffer, pH 8.1, gelöst und auf gleiche Weise gespalten.

3.1.1.4. Spaltung mit Thermolysin

Thermolysin, eine Protease aus Bacillus thermoproteolyticus Rokko, spaltet Proteine und Peptide spezifisch am Aminoende von Leucin, Isoleucin, Valin und Phenylalanin. Es wurde nur Enzym benutzt, das mit 40% Natrium-und Calziumacetat stabilisiert war (Serva, Heidelberg). Für präparative Spaltungen wurde etwa 0.75 mg nachzuspaltendes Peptid in 0.375 ml 0.2 M N-Methylmorpholin Puffer, pH 8.1, gelöst, und dann wurden 15 µl aus einer frisch bereiteten Enzymlösung (1 mg/ml) zugegeben. Nach zweistündiger Inkubation im Wasserbad bei 50°C und anschliessender Zugabe von 0.75 ml H_2O bidest wurde das Spaltungsgemisch eingefroren und lyophilisiert.

Nach der gleichen Prozedur wurden 10 nmol Protein bzw. nachzuspaltendes Peptid für analytische Zwecke in 80 µl 0.2 M N-Methylmorpholin Puffer, pH 8.1, gelöst und gespalten.

3.1.1.5. Spaltung mit Trypsin nach Blockierung der Lysin-Reste mit Citraconsäureanhydrid

Citraconsäureanhydrid modifiziert nach Dixon und Perham (1968) die freien Aminogruppen (N-Terminus und ε-Aminogruppen der Lysine) einer Polypeptidkette reversibel. Trypsin spaltet dann nur noch am Carboxylende der Arginine.

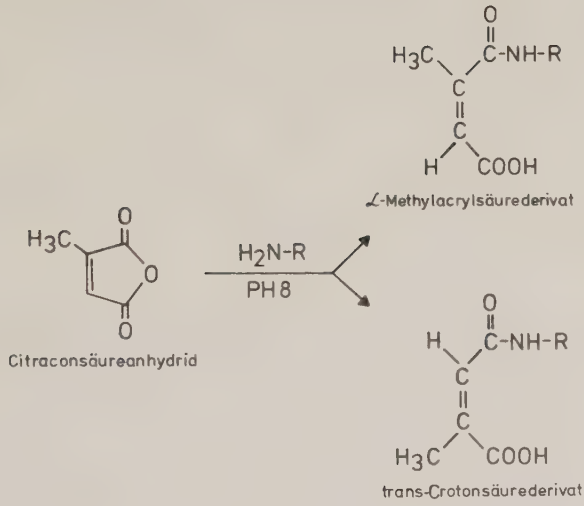


Abb. 4: Reaktion von Citraconsäureanhydrid mit primären Aminogruppen

5 mg Protein wurde in 1.5 ml 0.5% $NaHCO_3$ gelöst. 50 mg Citraconsäureanhydrid (Pierce, Rotterdam), d.h. circa 100facher molarer Überschuß über freie Aminogruppen, wurden bei Zimmertemperatur portionsweise unter Rühren zugegeben. Der stark absinkende pH-Wert wurde mit 5 N NaOH auf pH 8 gehalten. Nach Zugabe der letzten Portion Citraconsäureanhydrid wurde der Ansatz noch 10 Minuten bei pH 8 gehalten und dann über eine Sephadex G25 (fine)-Säule (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) (35 x 1 cm, Fließmittel 0.2% NH_4HCO_3) entsalzt. Nach dem Entsalzen betrug die Proteinkonzentration ungefähr 0.8 mg/ml. Zugabe von 100 µg Trypsin und einstündige Verdauung erfolgten unter den gleichen Bedingungen wie bei 3.1.1.1. Nach Zugabe von 5 ml H_2O bidest wurde die Probe eingefroren und lyophilisiert.

Zur Entblockierung der Aminogruppen wurde das lyophilisierte Peptidgemisch in 1 ml 50% Essigsaure aufgenommen, 4 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen und nach Zugabe von 10 ml H_2O bidest eingefroren und lyophilisiert.

3.1.2. Trennung der Peptide

3.1.2.1. Trennung auf Dünnschicht-Celluloseplatten

3.1.2.1.1. Peptidkartentechnik

Das Prinzip dieser Methode ist eine Kombination von Elektrophorese und Chromatographie. Zuerst wird die Elektrophorese und dann quer dazu aufsteigend die Chromatographie durchgeführt. 10-20 nmol Peptidgemisch wurden in 20 µl H_2O bidest gelöst, und auf Cellulosedünnschichtplatten (Polygram CEL 300 oder 400, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0.1 mm, Macherey-Nagel & Co., Düren), die für präparative Zwecke vorgereinigt (zunächst mit 5% Pyridin und dann mit 1.5% Ameisensäure) waren, punktförmig unter Warmluft aufgetragen. Dann wurden die Platten in Elektrophoresepuffer (Pyridin: Essigsäure: Aceton: Wasser = 1:2:8:40, pH 4,4) so eingetaucht, daß durch den gegenläufigen Strom des Puffers eine quer zur Elektrophorese-Richtung strichförmige Konzentrierung der Probe erfolgte. Anschließend wurden die Platten auf eine Elektrophorese-(DE-Doppelkammer, Desaga, Heidelberg) gelegt, und der Strom wurde eingeschaltet. Nach einem 5-minütigen Vorlauf bei 20 V erfolgte der Hauptlauf bei 480 V während 105 min. Nach beendeter Elektrophorese wurden die Platten unter Warmluft getrocknet und dann in PBEW-Puffer (Pyridin: n-Butanol: Essigsäure:Wasser = 50:75:15:60) im geschlossenen Tank aufsteigend chromatographiert. Zur Sichtbarmachung der Peptide wurden nach dem vollständigen Abtrocknen die für präparative Zwecke zu benutzenden Platten mit einer 0.1% Ninhydrin-Lösung (0.5 g Ninhydrin, 15 ml Collidin, 50 ml Essigsäure, 435 ml Athanol) und die für analytische Zwecke mit einer 0.3% Nin-

hydrin-Lösung (1.5 g Ninhydrin, 15 ml Collidin, 50 ml Essigsäure, 435 ml Äthanol) leicht besprüht. Ninhydrin bildet durch Reaktion mit den Aminogruppen von Proteinen, Peptiden und Aminosäuren einen gut sichtbaren, meistens blauvioletten Farbstoff. Abb. 5

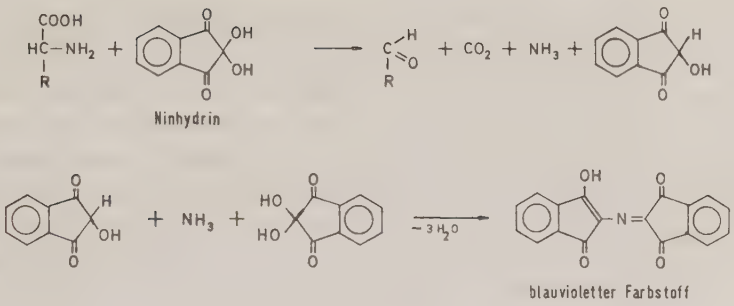


Abb. 5: Ninhydrin Reaktionsschema

Zum Trocknen und gleichzeitigem Beschleunigen der Farbreaktion wurden die Platten nach dem Besprühen unter Warmluft stehengelassen und dann zur Entwicklung des Farbstoffes im Dunkel über Nacht aufbewahrt. Peptide, deren N-terminale Aminosäure Gly ist, lassen sich als gelbe Flecken, Peptide mit Thr/Ser als N-terminale Aminosäure als grün/graue Flecken und Peptide mit N-terminale Aminosäure Tyr/His als bräunlich/graue Flecken erkennen. Diese Farbtöne sind nicht stabil. Sie wandeln sich sehr schnell in blauviolette Töne (Farbtöne der restlichen Peptide) um.

Die Flecken wurden von den Dünnschicht-Celluloseplatten mit einem Spatel abgekratzt und in 1.5 ml Eppendorf-Plastikreaktionsgefäße (Eppendorf Gerätebau, Netheler & Hinz GmbH, Hamburg) gefüllt. Peptide für Aminosäureanalysen wurden mit 0.2 ml 5.7 N HCl plus 0.02% ß-Mercaptoäthanol extrahiert. Nach 20-minütigem Schütteln wurde die Cellulose in einer Beckman-Mikrofuge B (Palo Alto, USA) während 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand in Hydrolysegläser überführt. Peptide für Sequenzanalysen wurden zweimal mit 0.2-0.8 ml 50% Essigsäure nach der gleichen Prozedur extrahiert.

3.1.2.1.2. Dünnschichtchromatographie

Für präparative Trennungen wurden 30-40 nmol Peptidgemisch strichförmig in einer Breite von 4-5 cm auf DC-Platten (CEL 400) unter Warmluft aufgetragen und dann in PBEW-Puffer aufsteigend chromatographiert. Die Sichtbarmachung der Peptide erfolgte durch sehr schwaches Besprühen mit 0.1% Ninhydrin-Lösung und die Extraktion der Peptide zweimal mit 0.8 ml 50% Essigsäure. Für analytische Zwecke wurden 2-5 nmol Peptidgemisch punktförmig auf DC-Platten (CEL 300) unter Warmluft aufgetragen und wie oben chromatographiert. Die Sichtbarmachung der Peptide erfolgte durch Besprühen mit 0.3% Ninhydrin-Lösung.

3.1.2.2. Trennung durch Gelfiltation

Durch diese Methode lassen sich Proteine und Peptide ihrer Größe entsprechend trennen. Sämtliche Gelfiltrationen wurden über die verschiedenen Sephadex-Typen (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) durchgeführt.

3.1.2.2.1. Sephadex-Säulengelfiltration

Zur Trennung der Peptide wurde nur eine Sephadex G50 (fine)-Säule (150 x 1 cm) benutzt. Das in 0,4 ml Fließ-

mittel (5% Essigsäure) gelöste Peptidgemisch wurde auf die Säule aufgetragen. Die Trennung der Peptide wurde erst von einem direkt an der Säule angeschlossenen Photometer (Isco, Lincoln, Nebraska, USA) durch Messen der Extinktion bei 280 nm registriert. Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 3 ml/h wurden Fraktionen von 0.5 ml gesammelt, von denen jede zweite zum Nachweis der enthaltenen Peptide durch Dünnschichtchromatographie und Ninhydrin-Anfärbung analysiert wurde.

3.1.3. Aminosäureanalysen

Zur Bestimmung der Bruttoanalyse des Proteins und der Peptide wurden diese in 0.2 ml HCl (doppelt destilliert; zum Oxidationsschutz empfindlicher Aminosäuren war 0.02% ß-Mercaptoäthanol zugesetzt) während 20 Stunden bei 110°C unter Vakuum hydrolysiert. Nach der Hydrolyse wurden die Proben unter Vakuum über NaOH-Plätzchen getrocknet, in 50 µl Citratpuffer pH 2.2 (1.96 g Na-citrat, 1.7 ml HCl, 2 ml Thiodiglycol, 0.1 ml Phenol pro Liter) aufgenommen und auf einem Durrum D-500-Aminosäureanalysator (Palo Alto, Kalifornien, USA) untersucht.

3.1.3.1. Nachweis und quantitative Bestimmung von Cystein-Resten in Proteinen

Zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Cysteinen wurden 0.5 mg Protein in 0.5 ml konzentrierter Ameisensaure gelöst, 20 µl 30% Wasserstoffperoxyd bei 0°C zugegeben und bei dieser Temperatur während 2 Stunden inkubiert (Hirs, 1956). Nach Zugabe von 2 ml H_2O bidest wurde die Probe eingefroren und lyophilisiert. Das dadurch oxydierte Protein wurde anschliessend in 0.2 ml 5.7 N HCl (doppelt destilliert) hydrolysiert, und eine Menge von 10 nmol Hydrolysat wurde auf dem Aminosäureanalysator untersucht (Hirs, 1956).

10 nmol in gleicher Weise behandeltes ß-Lactoglobin dienten als Referenz. Nach 5 1/2 Minuten erscheint der Cysteinsulfonsäure-Gipfel im Durrum D-500-Analysator.

3.1.3.2. Nachweis von Tryptophan-Resten mit Ehrlich Reagenz

Tryptophanhaltige Peptide lassen sich auf Dünnschicht-Celluloseplatten nach dem Besprühen mit p-Dimethylbenzaldehyd (Riedel de Haen, Hannover) in 2 N HCl (1 g/100 ml) und Trocknen bei 105°C als schwach rotviolette Flecken nachweisen (Spies Chambers, 1949; Tabone et al, 1950). Zu diesem Test wurden tryptische Peptidkarten benutzt, die von 10 nmol Protein auf DC-Platten (CEL 400) angefertigt wurden.

3.1.4. Sequenzanalysen

Sämtliche Peptide wurden manuell durch die Mikro-Dansyl-Edman-Technik (Gray und Hartley, 1976; Chen, 1976) sequenziert, während am intakten Protein automatische Sequenzierungen in einem modifizierten Beckman-Sequenator durch Dr. B. Wittmann-Liebold durchgeführt wurden. Sowohl die manuellen als auch die automatischen Sequenzierungen basierten auf dem Edman-Abbau.

3.1.4.1. Edman-Abbau

Proteine und Peptide lassen sich schrittweise vom Aminoende her mit Phenylisothiocyanat (PITC) abbauen (Edman, 1949). Der Abbau verläuft in folgenden Schritten (siehe Abb. 6): a) PITC bindet in alkalischem Milieu an die freie N-terminale Aminosäure sowie an die ε-Aminogruppen von Lysinen. b) Im sauren wasserfreien Medium wird dann die erste Aminosäure unter Ringschluß zum 2-Anilino-5-Thiazolinon-Derivat abgespalten und das Restpeptid oder Restprotein einem erneuten Zyklus des Edman-Abbaus unterworfen.

c) Beim automatisierten Edman-Abbau sowie bei der Dansyl-Edman-Technik (zur Unterscheidung hydrolyseempfindlicher Aminosauren) wird das mit organischen Lösungsmitteln extrahierte Thiazolinon zum stabilen 3-Phenyl-2-Thiohydantoin isomerisiert und anschliessend auf DC-Platten identifiziert.

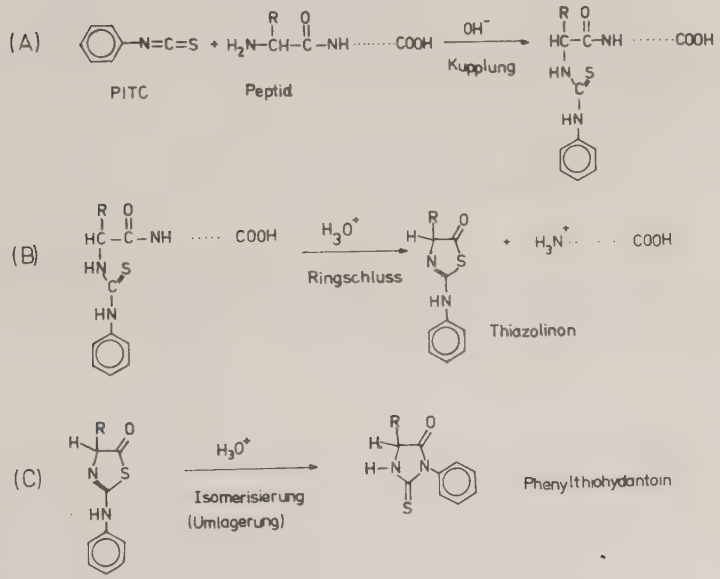


Abb. 6: Reaktionsschema des Edman-Abbaus

3.1.4.2. Manuelle Sequenzierung der Peptide mit der Mikro-Dansyl-Edman-Methode

3.1.4.2.1. Manueller Edman-Abbau

Bis zu 50 nmol Peptid wurden in einem Glasgefäß (0.4 x 5 cm) mit Schliffstopfen (NS 7,5 x 16) über NaOH abgetrocknet, in 100 µl H_2O bidest aufgenommen und wieder abge-

trocknet, um Essigsäure-Verunreinigungen zu vermeiden. Das Peptid wurde erneut in 50 µl H_2O bidest gelöst, und aus dieser wässerigen Peptidlösung wurden 1-2 nmol Peptid entnommen, um zur N-terminus-Bestimmung des Peptids dansyliert zu werden. Zur verbleibenden Peptidmenge wurden 50 µl 5% PITC (doppelt destilliert) in Pyridin (dreimal über Ninhydrin destilliert) unter Stickstoff zugegeben. Die Probe wurde bei 45°C im Heizblock während 60 Minuten inkubiert. Es erfolgte dann das vollständige Trocknen der Probe in einem auf 60°C vorgewärmten Exsikkator über NaOH und P_2O_5 an der Ölpumpe, und nach Zugabe von 100 µl doppelt destillierter Trifluoressigsäure (Fluka, Buchs, Schweiz) wurde bei 45°C im Heizblock während 30 Minuten inkubiert. Nach dem Trocknen über NaOH wurden 50 µl H_2O bidest zugegeben und dreimal mit 200 µl n-Butylessigester extrahiert. Die organische Phase wurde bei -20°C aufbewahrt, die wässerige Phase getrocknet und wieder in 50 µl H_2O bidest aufgenommen. Daraus wurde 1-2 nmol Peptid zur Dansylierung entnommen, und der Rest wurde einem neuen Abbauzyklus unterworfen.

3.1.4.2.2. Dansylierung

Durch Reaktion der freien Aminogruppen von Proteinen, Peptiden und Aminosäuren mit Dansylchlorid (DNS-Cl, 1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonylchlorid) kommt es zur Bildung der entsprechenden Sulfonamidderivate. Bei Proteinen und Peptiden werden diese Derivate durch Hydrolyse mit HCl plus 0.02% ß-Mercaptoäthanol freigesetzt (siehe Abb. 7), und sie können nach chromatographischer Trennung unter UV-Licht als gelbgrün fluoreszierende DNS-Aminosäuren identifiziert werden.

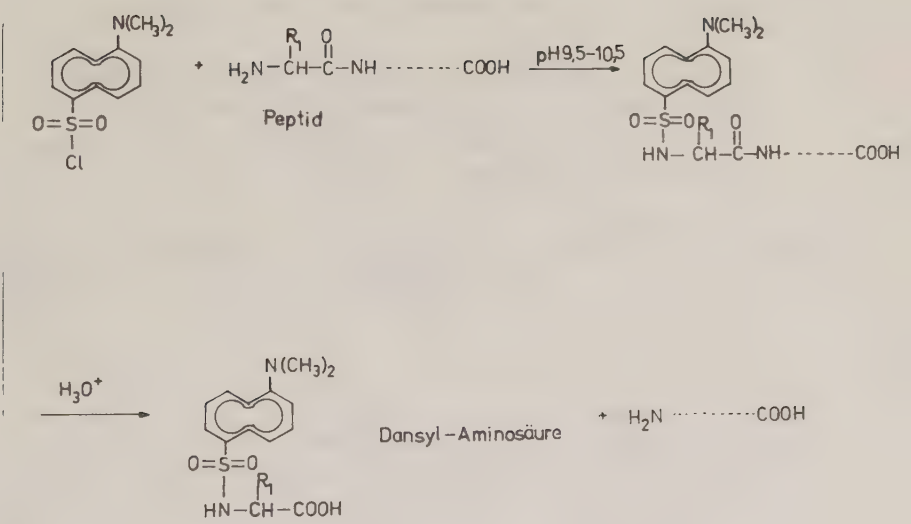


Abb.7: Reaktionsschema der Dansylierung

1-2 nmol wässerige Peptidlösung aus dem Edman-Zyklus wurden in kleine (5 x 0.3 cm) getemperte Gläschen überführt, zur Vermeidung von Verlusten in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und unter Vakuum über NaOH getrocknet. Nach Zugabe von 5 µl 0.2 M $NaHCO_3$ Lösung, Zentrifugation und Abtrocknen wurden 5 µl einer Mischung aus DNS-Cl in Aceton (2.5 mg/ml) und Wasser (1:1) zugefügt, zentrifugiert, mit Parafilm verschlossen und bei 45°C im Heizblock während ca. 20 Minuten (bis zum Verschwinden der gelben Farbe) inkubiert. Nach dem vollständigen Trocknen wurden 10 µl 5.7 N HCl/0.02 % ß-Mercaptoläthanol zugegeben und zentrifugiert. Die Gläser

geben und zentrifugiert. Die Glaser wurden zugeschmolzen und bei 105°C im Ofen während 16 Stunden inkubiert. Nach beendeter Hydrolyse wurden die Hydrolysate abzentrifugiert, die Gläser geöffnet, der Inhalt unter Vakuum über NaOH getrocknet und zur Chromatographie in 5 µl 95% Äthanol aufgenommen.

3.1.4.2.3. Chromatographie der DNS-Aminosäuren

Die DNS-Aminosäuren lassen sich durch aufsteigende Chromatographie auf Dünnschicht-Polyamidplatten in verschiedenen Fließmitteln, wie in Tabelle 1 zusammengefaßt, trennen.

Dimension	Laufmittel	Verhältnis der Laufmittel (V/V)	Laufrichtung	Auftrennung der DNS-Aminosäuren
1.	Ameisensäure Wasser	1.5 Teile 98.5 Teile		
2.	Toluol Eisessig	10 Teile 1 Teil	senkrecht zur 1.	Alle DNS-Aminosäuren außer den unter 3. und 4. angegebenen
3.	Äthylacetat Methanol Eisessig	20 Teile 1 Teil 1 Teil	wie 2.	DNS-Glu DNS-Asp DNS-Ser DNS-Thr
4.	0.05 M Na_3PO_4 Äthanol	3 Teile 1 Teil	wie 2.	DNS-His DNS-Lys DNS-Arg

Tab. 1: Bedingungen für die Auftrennung von Dansyl-Aminosäuren

Die Identifizierung der DNS-Aminosäuren erfolgte bei 254 nm unter einer UV-Lampe. Die Positionen der DNS-Aminosäuren sind nach aufsteigender Chromatographie in den vier oben

angegebenen Systemen in den Abbildungen 8-10 dargestellt

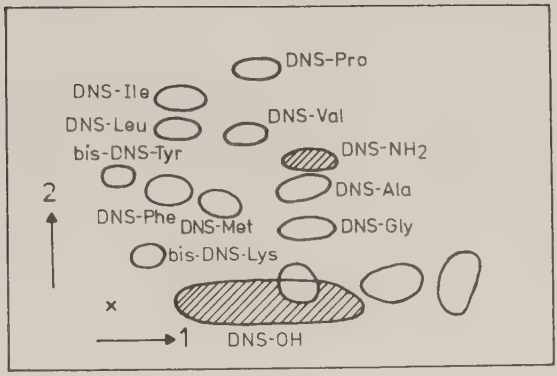


Abb. 8: Die DNS-Aminosäuren nach der 1. und 2. Dimension. Die nicht gekennzeichneten Flecke stellen Gemische von DNS-Aminosäuren dar, die erst durch die Chromatographie im 3. System getrennt werden.

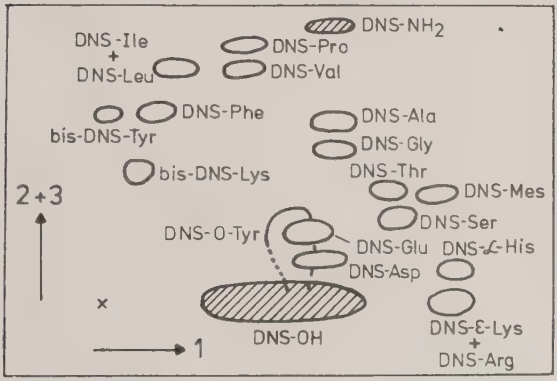


Abb. 9: Die DNS-Aminosäuren nach der dritten Dimension; DNS-O-Tyr ergibt einen großen Fleck, der z.T. gestrichelt eingezeichnet ist.

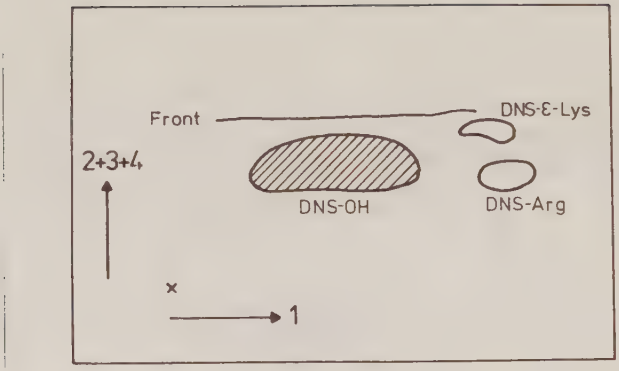


Abb. 10: Die DNS-Aminosäuren nach der 4. Dimension

Zur Identifizierung der DNS-Aminosäuren einer Probe wurden ca. 0.2 µl einer DNS-Aminosäuren-Referenzlösung (DNS-Pro, DNS-Ile, DNS-Phe, DNS-Gly, DNS-Ser, DNS-Arg, je 0.1 mg/ml 95% Äthanol) auf die eine Seite von beidseitig beschichteten Polyamiddünnschichtplatten, 5 x 5 cm (DC-Fertigfolien, F 1700, Schleicher und Schüll, Dassel) mittels einer Schablone punktförmig aufgetragen. Die in 5 µl 95% Äthanol gelöste Probe wurde auf die andere Seite der Platte genau der Referenz gegenüber auf gleiche Weise möglichst konzentriert unter Warmluft aufgetragen. Es erfolgten Chromatographie, wie oben beschrieben und Identifizierung bei 254 nm unter einer UV-Lampe durch Vergleich der Positionen der betroffenen DNS-Aminosäuren zu den Positionen der DNS-Aminosäuren der Referenz. Die Probe enthielt ein durch saure Hydrolyse entstandenes Aminosäuregemisch. Daher waren DNS-Asparagin und DNS-Glutamin durch Abspaltung der Amidgruppen zu den entsprechenden sauren Aminosäuren umgewandelt und Tryptophan war zerstört. Infolgedessen konnte nicht zwischen

DNS-Asp/DNS-Asn bzw. DNS-Glu/DNS-Gln unterschieden werden. Eine Unterscheidung zwischen Asp/Asn bzw. Glu/Gln gelang allerdings durch Chromatographie und durch Anfärbung der entsprechenden Phenylthiohydantoine mit Ninhydrinreagenz auf DC-Platten (Chen, 1976).

3.1.4.2.4. Isomerisierung der Thiazolinon-Derivate in PTH-Aminosäuren (Konvertierung)

Die n-Butylessigester-Phasen wurden getrocknet und nach Zugabe von 200 µl 1 N HCl in Stickstoffatmosphäre bei 80°C im Wasserbad während 5 Minuten inkubiert. Nach der Extraktion (dreimal mit 200 µl Äthylessigester) wurde die organische Phase getrocknet und zur Chromatographie in 20 µl Dichloräthan/Methanol (7:3, V/V) gelöst.

3.1.4.2.5. Chromatographie der PTH-Aminosäuren

Die in 20 µl Dichloräthan/Methanol (7:3, V/V) gelöste Probe wurde auf mit Methanol/Propanol-1/Propanol-2 (98:1:1, V/V) gereinigte DC-Alufolieplatten (20 x 20 cm; Kieselgel 60 F 254 Merck, Darmstadt) unter Kaltluft punktförmig aufgetragen. Daneben wurden 5 µl einer Referenzlösung mit den entsprechenden PTH-Aminosäuren (je 5 nmol/ µl) auf gleiche Weise aufgetragen. Es erfolgte aufsteigende Chromatographie, und zwar erst in Chloroform/Propanol-1/Propanol-2 (98:1:1, V/V) und dann, nach dem vollständigen Trocknen unter Kaltluft, in gleicher Richtung in Dichloräthan:Eisessig (6:1, V/V). Nach dem Trocknen der Platte erschienen die PTH-Aminosäuren bei 254 nm unter der UV-Lampe als voneinander getrennte Flecken. Weiter wurde die Platte mit einer frisch bereiteten Lösung von 100 mg Ninhydrin (in 5 ml Collidin und 95 ml

Äthanol) stark besprüht. Nach fünfminütigem Trocknen bei 110°C waren die farbigen Flecken zum endgültigen Auswerten gut sichtbar. Die Identifizierung der betroffenen PTH-Aminosäuren erfolgte durch Vergleich ihrer Wanderungsstrecke und Farbe mit der Wanderungsstrecke und Farbe der Referenz-PTH-Aminosäuren.

3.1.4.2.6. Rückspaltung der Thiazolinon-Derivate

Zur Bestimmung der schlecht identifizierbaren DNS-Aminosäuren (z.B: DNS-His und DNS-Lys) und zur Unterscheidung zwischen DNS-Leu und DNS-Ile wurden die in den n-Butylessigesterextrakten befindlichen Thiazolinone getrocknet, in 200 µl HJ (57% zur Analyse; stabilisiert mit H_3PO_3, Riedel de Haen, Hannover) bzw. bei Methionin in 200 µl 5.7 N HCl/0.02% ß-Mercaptoäthanol aufgenommen, bei 130°C unter Vakuum während 20 Stunden hydrolysiert und auf dem Aminosäureanalysator untersucht. Serin wird bei der Rückspaltung in Alanin, Threonin in α-Aminobuttersäure und Isoleucin bis zu ca. 50% in Norleucin umgewandelt.

3.2. Isolierung des ribosomalen Proteins S1. Fragmentierung dieses Proteins mit BrCN, Isolierung und Charakterisierung von BrCN-Fragmenten

Sämtliche Puffer, die dazu benutzt wurden, sind in den Tabellen 2 und 3 zusammengefaßt.

3.2.1. Isolierung des ribosomalen Proteins S1

3.2.1.1. Bakterienzüchtung

In einem 50 Liter Fermenter (Fa. Giovanola Freres S.A., Montley, Schweiz) und in Medium, das pro Liter 5 g NaCl, 2 g Hefeextrakt und 10 g Bacto-Trypton (Difco Laboratories, Detroit, USA) enthielt, wurden E.coli Bakterien, Stamm MRE 600, gezüchtet. Vor dem Animpfen wurden pro Liter 10 ml sterilisierte 50 % Glukoselösung zugegeben und mit 1 Liter Bakterien, die über Nacht im gleichen Medium plus 2 ml 1 N NaOH/Liter gewachsen waren, angeimpft. Das Wachstum erfolgte bei 37°C, und der pH-Wert wurde durch Zugabe von 4 N NaOH bei pH 7,5 gehalten. Das Bakterienwachstum wurde durch Messen der Extinktion bei 540 nm verfolgt, und bei einer optischen Dichte von ca. 5 (späte logarithmische Phase) wurden die Bakterien in einer Durchflußzentrifuge geerntet. Eine Züchtung ergab ca. 350 g Bakterien, die bei -80°C aufbewahrt wurden.

3.2.1.2. Isolierung von Ribosomen

200 g tiefgefrorene Zellen wurden nach Zugabe von 300 g Al_2O_3 in einer Mühle bei einer Temperatur von 0-4°C während 40 Minuten gemahlen. Es erfolgte die Zugabe von 400 ml Puffer I, dem vorher 0,2 ml einer frisch bereiteten DNAase-Lösg.(1 mg DNAase in 1 ml Puffer I) zugegeben war. Die Bakterien wurden für weitere 15 Minuten gemahlen, und die Suspension wurde zum Entfernen von Al_2O_3 und groben Zellbruchstücken zweimal bei 30.000 g während

Puffer	Zusammensetzung	pH
I	10 mM Tris-HCl 50 mM KCl 10 mM Mg-acetat 7 mM ß-Mercaptoäthanol	7.6
II	10 mM Tris-HCl 50 mM KCl 10 mM Mg-acetat 7 mM ß-Mercaptoäthanol 1 M NH_4Cl	7.6
III	10 mM Tris-HCl 50 mM KCl 10 mM Mg-acetat 7 mM ß-Mercaptoäthanol 0.3 M NH_4Cl	7.6
IV	6 M Harnstoff 2 mM Na-acetat 7 mM ß-Mercaptoäthanol	5.5
V	0.25 M Na-PO_4 (NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4)	7.1
VI	0.05 M Na-PO_4 (NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4) 0.1 % SDS	7.1
VII	10 mM Tris-HCl 7 mM ß-Mercaptoäthanol	7.8

Tab. 2: Zusammenfassung von Puffern, die zur Proteinpräparation benutzt wurden

30 Minuten in einer Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand, der die Ribosomen enthielt, wurde bei 160.000 g während 4 Stunden in einer Beckman-Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Ribosomen enthaltende Niederschlag wurde in 300 ml Puffer II bei 4°C über Nacht gelöst und bei 30.000 g während 30 Minuten zum Entfernen ungelöster Partikel zentrifugiert. Nach sechsstündiger Zentrifugation des Überstandes bei 160.000 g wurde der Überstand bei -20°C aufbewahrt und das Sediment in 100 ml Puffer II bei 4°C über Nacht gelöst. Zur Ribosomen-Konzentrationsbestimmung wurden die Extinktionswerte bei 260 nm in folgende Berechnungsformel eingefügt: Ribosomenkonzentration (mg/ml) = E 260 nm x Verd. Faktor x 0.06. 200 g Zellen ergaben eine Ausbeute von ca. 3 g Ribosomen.

3.2.1.3. Reinigung des ribosomalen Proteins S1

Die Reinigung des ribosomalen Proteins S1 erfolgte nach einer von Subramanian (persönliche Mitteilung) ausgearbeiteten Methode.

3.2.1.3.1. Waschen der Ribosomen mit Äthanol

Zum Entfernen der Proteine L7/12, die bei der Aufarbeitung des Proteins S1 stören, wurden die 70S Ribosomen nach der Methode von Hamel et al (1972) mit Äthanol gewaschen. Dazu wurden zu den in 100 ml Puffer II gelösten ca. 3 g Ribosomen 500 ml vom gleichen Puffer hinzugegeben, um die Ribosomenkonzentration auf 5 mg/ml herabzusetzen. Nach Zugabe von 0.01 Vol 1 M Mg-acetat und 1 Vol absolutem Äthanol bei 0°C wurde für 30 Minuten gerührt und anschließend bei 20.000 g für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand (L7/L12) wurde bei -20°C aufbewahrt und der Niederschlag (Ribosomen) in 200 ml Puffer III gelöst.

3.2.1.3.2. Extraktion der ribosomalen Proteine mit 4 M LiCl/8 M Harnstoff

Zu den in 200 ml Puffer III gelösten ca. 3 g Ribosomen, die durch Zugabe von 100 ml vom gleichen Puffer auf eine Konzentration von 10 mg/ml gebracht wurden, wurde 1 Vol frisch bereiteter 4 M LiCl/8 M Harnstoff-Lösung bei 0°C unter Rühren zugegeben. Nach 24stündiger Inkubation des Ansatzes bei 0°C erfolgte eine Zentrifugation bei 20.000 g für 30 Minuten. Zum Überstand (ribosomale Proteine) wurden ca. 3 Vol Aceton portionsweise unter Rühren bei 0°C gegeben, und es wurde für weitere 60 Minuten gerührt. Es erfolgte Zentrifugation bei 20.000 g für 30 Minuten, nach der der Niederschlag (ribosomale Proteine) in 300 ml "Säulenpuffer" (Puffer IV) bei 0°C über Nacht gelöst wurde. Nach 30minütiger Zentrifugation bei 20.000 g wurde der klare Überstand zur Trennung der Proteine weiterverarbeitet.

3.2.1.3.3. Trennung der basischen von den sauren ribosomalen Proteinen am Ionenaustauscher

Zur Trennung der basischen und sauren ribosomalen Proteine wurden die in 300 ml Puffer IV gelösten ribosomalen Proteine auf eine mit Diäthylaminoäthan-Cellulose (DEAE-Cellulose) (Whatman,DE 52) gepackte Säule (3 x 25 cm) aufgetragen. Proteine, die an DEAE-Cellulose nicht binden, wurden mit 400 ml Puffer IV eluiert, während die an der Säule gebundenen Proteine mit 400 ml Puffer IV/0.2 M NaCl eluiert wurden. Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 50 ml/h wurden Fraktionen von 16 ml bei 4°C gesammelt. Die Trennung der Proteine wurde von einem direkt an der Säule angeschlossenen Photometer, wie bei (3.1.2.2.1.) beschrieben, als Kurve mit einem frühen Gipfel (basische Proteine) und einem späten Gipfel (saure Proteine) registriert. Die basischen Proteine wurden bei -20°C aufbewahrt und die sauren durch eine mit (PM10) Membran versehene Diaflo-Apparatur (Amicon,

USA) auf 20 ml konzentriert.

3.2.1.3.4. Abtrennung der sauren hochmolekularen von den sauren niedermolekularen Proteinen durch Gelfiltration

Die auf 20 ml durch Diaflo (PM 10) konzentrierten sauren ribosomalen Proteine wurden auf eine Ultrogel-Säule (3 x 50 cm) (ACA 34, Industrie Biologique France) aufgetragen. Die Elution erfolgte bei 4°C mit dem Puffer IV. Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 16 ml/h wurden Fraktionen von 8 ml gesammelt, wobei die Trennung durch ein Photometer, wie bei (3.1.2.2.1.) beschrieben, als Kurve mit einem frühen Gipfel (hochmolekulare saure Proteine) und einem späten Gipfel (niedermolekulare saure Proteine) registriert wurde. Die Fraktionen des späten Gipfels wurden vereinigt und bei -20°C aufbewahrt. Die Fraktionen des frühen Gipfels, in denen das Protein S1 enthalten sein sollte, wurden bei der ersten Präparation vereinigt; bei einer zweiten parallel laufenden Präparation wurden sie zum Nachweis der enthaltenen Proteine erst analysiert (s. 3.2.1.3.7.) und dann ihrem Inhalt entsprechend vereinigt.

3.2.1.3.5. Trennung der hochmolekularen sauren ribosomalen Proteine am Ionenaustauscher

Die nach Ultrogelfiltration vereinigten Fraktionen des frühen Gipfels wurden auf eine DEAE-Cellulose/(Whatman, DE 52) Säule (2 x 50 cm) aufgetragen. Die Proteine wurden mit einem linearen Gradienten eluiert, der sich bei der ersten Präparation aus 400 ml Puffer IV und 400 ml Puffer IV/0.2 M NaCl sowie aus 400 ml Puffer IV/0.01 M NaCl und 400 ml Puffer IV/0.14 M NaCl bei der zweiten Präparation zusammensetzte. Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 40 ml/h, die mit Hilfe einer LKB-Peristaltikpumpe erreicht wurde, wurden Fraktionen von 8 ml gesammelt, von denen

jede zweite auf Protein getestet wurde (s. 3.2.1.3.6.). Die Werte wurden als Kurve gezeichnet. Von den Gipfeln wurde jede zweite Fraktion zur Identifizierung der eluierten Proteine analysiert (s. 3.2.1.3.7.).

3.2.1.3.6. Quantitative Proteinbestimmung

Alle Proteinbestimmungen erfolgten nach einer leicht modifizierten Form der Methode von Lowry et al (1951). Dazu wurden Aliquots von den zu testenden Proteinlösungen mit 1 ml einer Lösung, die sich aus 48 ml 2% Na_2CO_3/ 0.1 N NaOH, 1 ml 0.5% $CuSO_4$ und 1 ml 1% Na-Tartrat zusammensetzte, versetzt. Anschließend wurde geschüttelt und 10 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach Zugabe von je 50 µl Folin-Ciocalteu-Reagenz wurde gemischt und frühestens nach 30 Minuten die Extinktion im Zeiss-Photometer bei 750 nm gemessen. Die Extinktionswerte wurden mit Hilfe einer Eichkurve in Proteinmengen umgesetzt. Die Eichkurve wurde von den Extinktionswerten hergestellt, die von 10, 20, 40, 60 und 80 µg nach dem gleichen Prinzip behandeltem Rinderserum-Albumin gewonnen wurden.

3.2.1.3.7. Identifizierung der eluierten Proteine

Die Identifizierung der eluierten Proteine erfolgte durch eine leicht modifizierte Form der DISK-SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Weber und Osborn, 1969). Durch diese Methode lassen sich Proteine ihrer Größe entsprechend elektrophoretisch trennen. Dazu wurden Aliquots von den zu testenden Fraktionen, die 5-20 µg Protein enthielten, mit 105 µl der folgenden Lösung versetzt: 8 ml Puffer V, 8 ml 10% SDS, 20 ml Glycerin, 2 ml ß-Mercaptoäthanol, 1 ml 10% Bromphenol-Blau, 161 ml H_2O bidest. Dann wurde im Wasserbad bei 65°C während 10 Minuten inkubiert. Nach dem Auftragen der Proben auf zylinderförmige SDS-Polyacrylamidgele, die sich aus 6 ml Puffer V, 3 ml 1% SDS, 15 ml 20% Acrylamid/0.5% Bisacrylamid und 6 ml H_2O bidest. zusammen-

setzten, erfolgte eine Elektrophorese von der Kathode zur Anode im Puffer VI zunächst bei 2.5 mA pro Gel für 30 Minuten und dann bei 5 mA pro Gel, bis der Marker (Bromphenol Blau) durch die Gele gelaufen war (ca. 4 Stunden). Die getrennten Proteine wurden zur Sichtbarmachung mit einer Coomassie Blau-Lösung (50% Methanol, 7.5% Essigsäure, 0.1% Coomassie Blau) angefärbt. Die Gele wurden dann zur Entfernung der nicht an Proteinen gebundenen Farbstoff-Moleküle mit einer (5% Methanol, 7.5% Essigsäure)-Lösung gewaschen.

Protein S1-enthaltende Fraktionen wurden vereinigt, durch Diaflo (PM 10) auf ca. 5 ml konzentriert, gegen Puffer VII bei 4°C dialysiert und auf Protein getestet.

3.2.1.3.8. Überprüfung der Identität und Reinheit von isolierten Proteinen

Die Identität und Reinheit von isolierten Proteinen wurde durch eine zweidimensionale Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Subramanian, 1974) überprüft. Durch diese Methode lassen sich Proteine nach ihrer elektrischen Ladung (erste Dimension) und nach ihrer Größe (zweite Dimension) auftrennen.

Dazu wurden 5-12 µg proteinenthaltende Aliquots aus den zu testenden Proteinlösungen mit 5 µl 2 M HCl und 20 µl der folgenden Lösung versetzt: 50 ml Puffer VIII, 50 ml Glycerin und 5 mg basisches Fuchsin. Sie wurden dann auf zylinderförmige Gele mit folgender Zusammensetzung aufgetragen: 9.6 g Harnstoff, 8.7 ml H_2O bidest., 2 ml Puffer IX, 2 ml 40% Acrylamid/1% Bisacrylamid. Als Anodenpuffer dienten: 40 ml Puffer VIII plus 360 ml H_2O bidest. und als Kathodenpuffer: 50 ml Puffer X plus 950 ml H_2O bidest. Die Proteinwanderung erfolgte von der Anode zur Kathode bei 3 mA pro Gel während ca. 4 Stunden in der ersten Dimension.

Nach beendeter Elektrophorese wurden die zylinderförmigen Gele auf flache Gele mit folgender Zusammensetzung aufgelegt: 102 ml Puffer XI, 102 ml 20% Acrylamid/1% Bisacrylamid. Durch eine Polyacrylamidlösung (12.6 g Harnstoff, 9.5 ml H_2O bidest., 7.5 ml Puffer XI, 3 ml 40% Acrylamid/1% Bisacrylamid, 0.3 ml 20% SDS) kam es zur Verbindung der beiden Gele. Der Kathodenpuffer bestand aus 40 ml Puffer XII, 360 ml H_2O bidest. und 60 l Thioglycolsäure und der Anodenpuffer aus 100 ml Puffer XI und 900 ml H_2O bidest. Die Elektrophorese erfolgte von der Kathode zur Anode bei 25 mA pro Gel für ca. 5 Stunden in der zweiten Dimension.
Das Anfärben der auf den flachen Gelen getrennten Proteine und das Entfärben der Gele erfolgten wie bei (3.2.1.3.7.) beschrieben.

3.2.1.3.9. Weitere Reinigung des isolierten S1 durch Gelfiltration

Da das nach der DEAE-Cellulose-Säule gewonnene S1 nicht ausreichend sauber war, wurde es in einem Volumen von 5 ml auf eine G150 Sephadex-Säule (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) (2 x 200 cm) aufgetragen und mit dem Puffer IV eluiert. Es wurden 5 ml Fraktionen bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 5 ml/h gesammelt. Die Absorption bei 280 nm wurde, wie bei (3.1.2.2.1.) beschrieben, als Kurve registriert, von deren Gipfeln jede zweite Fraktion zum Nachweis der eluierten Proteine elektrophoretisch, wie bei (3.2.1.3.7.) beschrieben, analysiert wurde. Die vereinigten S1-enthaltenden Fraktionen wurden durch Diaflo (PM 30) bei 0°C auf 5 ml konzentriert. Daran schlossen sich an Dialyse gegen Puffer VII bei 4°C, Proteinbestimmung und Überprüfung der Identität und Reinheit wie bei (3.2.1.3.6., 3.2.1.3.8.) beschrieben.

Puffer	Zusammensetzung	pH
VIII	0.10 M Bistris-acetat	4.0
IX	0.57 M Bistris-acetat	5.0
X	1.79 M K-acetat	5.0
XI	0.25 M Bistris-HCl	6.75
XII	0.70 M Bistris 0.07 M MES 2 % SDS	6.5

Tab. 3: Zusammenfassung der Puffer, die zur Durchführung der zweidimensionalen Elektrophorese benutzt wurden.

3.2.2. Fragmentierung des ribosomalen Proteins S1 mit BrCN

Durch Reaktion von BrCN mit der Seitenkette des Methionins ergibt sich ein Gemisch aus Homoserin, Homoserinlacton und Methylthiocyanat. Nach diesem Prinzip werden Proteine und Peptide am Carboxylende des Methionins gespalten, Abb. 11 (Gross und Witkop, 1961).

Für analytische Spaltungen wurde ca. 1 mg Protein S1 in (10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 7 mM ß-Mercaptoäthanol)-Puffer mit ß-Mercaptoäthanol (Endkonzentration: 1%) versetzt und bei 37°C für 15 Minuten inkubiert. Nach der Dialyse gegen

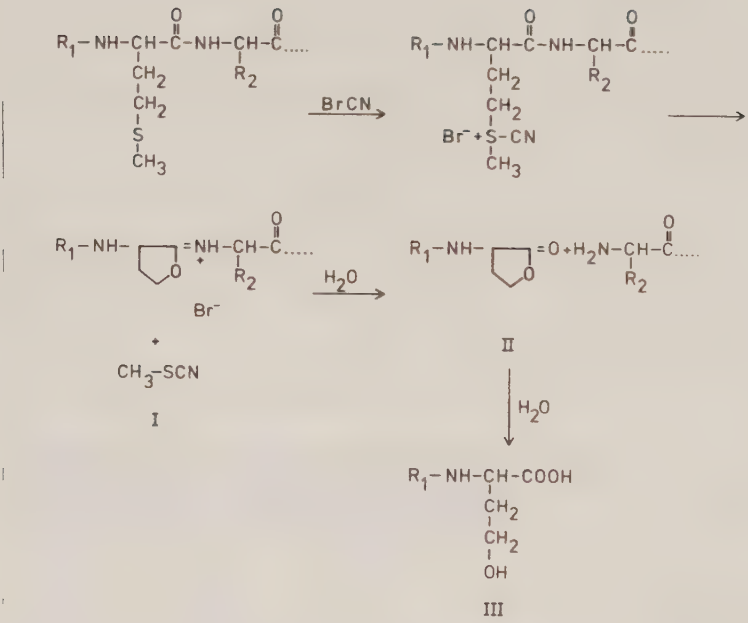


Abb. 11: Spaltung einer Peptidkette mit BrCN. I, Methylthiocyanat; II, Peptid mit C-terminalem Homoserinlacton; III, Peptid mit C-terminalem Homoserin.

H_2O bidest. bei 0°C wurde lyophilisiert. Zu dem in 90% Ameisensäure gelösten Lyophilisat wurden 50 µl einer frisch bereiteten Lösung (100 mg BrCN/ml 90% Ameisensäure) unter Stickstoff hinzugegeben, und der Ansatz wurde im Wasserbad bei 30°C für 48 Stunden inkubiert.

Nach Zugabe von 2 ml H_2O bidest. wurde lyophilisiert; das Lyophilisat wurde in 0.2 ml Lösung (8 M Harnstoff/0.1 % ß-Mercaptoäthanol) aufgenommen und durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese analysiert (s. 3.2.1.3.7.). Unter den gleichen Bedingungen wurden ca. 8 mg Protein S1 präparativ gespalten und elektrophoretisch analysiert.

3.2.3. Isolierung von BrCN-Fragmenten durch Gelfiltration

Das durch die präparative Spaltung erhaltene und in ca. 2 ml Puffer (8 M Harnstoff/0.1% Mercaptoäthanol) gelöste Fragmentengemisch wurde auf eine G100 Sephadex-Säule (170 x 1 cm) aufgetragen und mit dem gleichen Puffer als Fließmittel bei Zimmertemperatur eluiert. Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 6 ml/h wurden Fraktionen von 1 ml gesammelt, wobei die Trennung der Fragmente durch ein Photometer (s. 3.1.2.2.1.) als Kurve registriert wurde. Jede zweite Fraktion wurde zum Nachweis der enthaltenen Fragmente durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (siehe 3.2.1.3.7.) analysiert. Fraktionen mit nur einer einzigen Bande wurden vereinigt und auf Identität und Reinheit durch zwei-dimensionale Polyacrylamidgel-Elektrophorese (s. 3.2.1.3.8.) getestet.

3.2.4. Charakterisierung von isolierten BrCN-Fragmenten

3.2.4.1. Molekulargewichtsbestimmung von isolierten BrCN-Fragmenten durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Dazu wurde das isolierte BrCN-Fragment auf SDS-Polyacrylamidgele (s. 3.2.1.3.7.) allein bzw. zusammen mit Vergleichsproteinen von bekannten Molekulargewichten (Rinderserum-Albumin, Ovalbumin und Chymotrypsinogen) aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde mit Hilfe einer Eichkurve, die von den Molekulargewichtswerten der Vergleichsproteine hergestellt wurde, das Molekulargewicht des BrCN-Fragments bestimmt.

4. Ergebnisse

4.1. Primärstruktur des ribosomalen Proteins L15

4.1.1. Nachweis und quantitative Bestimmung von Cysteinresten

Mit 10 nmol hydrolysiertem und oxydiertem Protein wurden Aminosäurebruttoanalysen im Durrum-Analysator bei 2.0 OD durchgeführt. Der in der Referenz (ß-Lactoglobulin) auftretende Cysteinsäure-Gipfel fehlte in der Analyse von Protein L15. Die Anwesenheit von Cysteinresten konnte so ausgeschlossen werden.

4.1.2. Spaltung des Proteins L15 mit Trypsin

4.1.2.1. Prüfung auf Tryptophanreste

Auf einer mit 10 nmol tryptischer Peptide angefertigten Peptidkarte konnte nach dem Besprühen mit Ehrlich-Reagenz kein rotvioletter Fleck (Anwesenheit von Tryptophan) beobachtet werden.

4.1.2.2. Isolierung der tryptischen Peptide

Aus der tryptischen Spaltung des Proteins wurden 21 Peptide (T2, T3, T4, T5, T6, T8, T10, T11, T14, T16, T17, T18, T19, T20, T21, T22, T24, T26, T28, T29 und T30) in reiner Form durch die Peptidkartentechnik (Abb. 12) isoliert. Die restlichen tryptischen Peptide wurden aus tryptischen Nachspaltungen von Lysin-blockierten tryptischen Peptiden (LBT-Peptide) und aus der Spaltung des Proteins mit Staphylococcus aureus Protease (SP-Peptide) gewonnen. Wenn die Bruttoanalysen der tryptischen Peptide (Tab. 4) etwas höhere Aminosäurewerte ergaben, als sie aus der Sequenz der Peptide zu erwarten sind, so ist dies auf Ver-

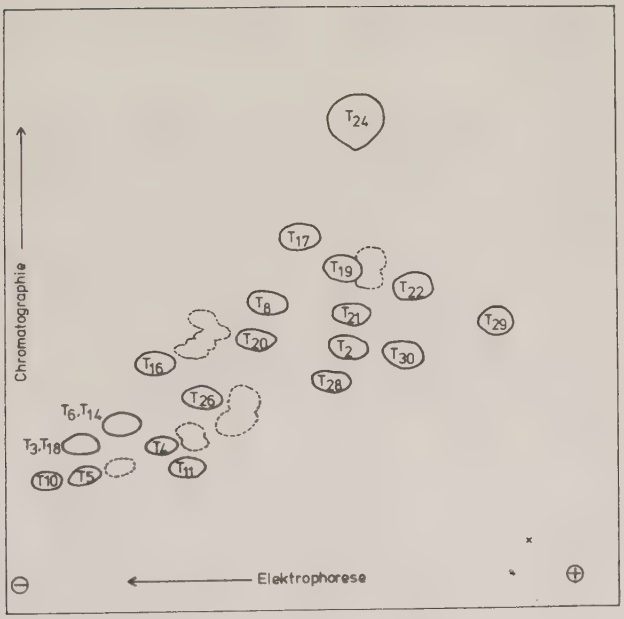


Abb. 12: Peptidkarte der Peptide aus der tryptischen Spaltung des Proteins L15

Peptide	Asx	Thr	Ser	Glx	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg
T2	1.17	1.00	2.02	1.16	1.00	1.55	1.09				2.01				0.81	
T3,T18															1.00	
T4						1.77	1.00								0.82	
T5						1.81	1.00								1.42	
T6,T14																1.00
T8			1.05			3.57				1.01	1.00				0.81	
T10						1.41								1.00	0.98	
T11				1.00		1.23									0.84	
T16					0.85						1.00				0.82	0.75
T17		1.00	1.09			1.26							1.61			1.10
T19		1.00		1.20			2.65			1.95						0.90
T20		1.00		1.23			2.58			2.07					0.60	0.72
T21	1.10		1.13				1.00				1.97				0.83	
T22	1.97	1.00		1.45		2.74		2.76			2.31				1.10	
T24		2.60		1.00	0.98	1.20	1.10	3.66		0.75	1.16					1.06
T26		1.00						0.89							0.89	
T28				1.16		2.30	3.67			1.00					0.90	
T29				2.40						1.00						
T30				2.70		2.20	4.02			1.83					1.00	

Tab. 4: Aminosäurenbruttoanalysen der aus der tryptischen Spaltung des Proteins L15 gewonnenen Peptide

unreinigung mit einigen Aminosäuren (besonders bemerkbar bei Gly) zurückzuführen. In dem Fall, in dem die experimentellen Werte etwas niedriger sind als erwartet, kann dies auf folgende Gründe zurückzuführen sein: Zerstörungen empfindlicher Aminosäuren (z.B. Tyr, Thr, Lys, Arg) bei der Hydrolyse; Zerstörungen der N-terminalen Aminosäuren durch die Ninhydrinreaktion; unvollständige Hydrolysen von Peptidbindungen, z.B. von Ile-Leu, Val-Ile und Val-Val.

4.1.2.3. Sequenzierung der aus der tryptischen Spaltung des Proteins L15 gewonnenen Peptide

Der hohe Reinheitsgrad der durch die Peptidkarten-Technik isolierten Peptide war ein wichtiger Beitrag zu einer relativ leicht nach der Mikro-Dansyl-Edman-Methode durchgeführten Primärstrukturermittlung. Bei jedem Peptid konnte die C-terminale Aminosäure auf Grund der Bruttoanalyse vorausgesagt werden, aber es wurden zur Sicherheit noch ein bis zwei weitere Abbauschritte vorgenommen.

T2 Leu-Asn-Thr-Leu-Ser-Pro-Ala-Glu-Gly-Ser-Lys
10

Das Peptid wurde ohne Probleme sequenziert, wobei die Bestimmung von Asn und Glu durch Konvertierung der entsprechenden Thiazolinon-Derivate und anschließende Chromatographie der PTH-Derivate erfolgte. Lysin, das nicht N-terminal ist, erscheint auf der Polyamid-Platte nicht in der bis-DNS-Lys Position, sondern auf der von DNS-Leu nach der zweiten Dimension und auf der der von DNS-Phe nach der dritten Dimension. Die ε-Aminogruppe des Lysins wird mit PITC nach dem ersten Edman-Zyklus irreversibel umgesetzt.

T3, T18 Lys

Daß es sich bei dem freien Lys auf der Peptidkarte um

zwei verschiedene Stellen der Proteinkette handelt, wurde erst festgestellt, als alle Überlappungen gefunden waren.

T4 Ala-Gly-Lys

T5 Lys-Ala-Gly-Lys

Das Peptid T5, dessen Sequenzierung wie die von T4 ohne Probleme ablief, entstand durch unvollständige enzymatische Spaltung.

T6,T14 Arg

Bei dem freien Arg auf der Peptidkarte wurde (wie im Fall von Lysin bei T3T18) erst bei der Zuordnung der Peptide festgestellt, daß es sich ebenfalls um zwei verschiedene Positionen in der Proteinkette handelt.

T8 Gly-Ile-Gly-Ser-Gly-Leu-Gly-Lys

T10 Gly-His-Lys

Die Peptide T8 und T10 wurden ohne Schwierigkeiten sequenziert. Die 2. Position des Peptids T10 ergab beim Dansyl-Edman keine Aminosäure. Durch Rückspaltung des entsprechenden Thiazolinon-Derivats wurde Histidin in dieser Position nachgewiesen.

T11 Gly-Gln-Lys

Daß es sich bei der Aminosäure in der zweiten Position um Glutamin (und nicht um Glutaminsäure) handelt, wurde durch Konvertierung nachgewiesen. Dieses Ergebnis stimmt auch mit der Position des Peptids auf der Peptidkarte überein.

T16 Arg-Leu-Pro-Lys

Das Peptid Leu-Pro-Lys, das nach tryptischer Spaltung zu erwarten ist, konnte nicht gefunden werden. Offensichtlich ist die Peptidbindung zwischen Arg und Leu in diesem Fall nicht gespalten.

T17 Phe-Gly-Phe-Thr-Ser-Arg

Die Sequenzierung des Peptids wurde ohne Schwierigkeiten durchgeführt.

T19 Ala-Ala-Ile-Thr-Ala-Glu-Ile-Arg

Das Peptid T19 war etwas durch T15 verunreinigt. Allerdings störte dies die Sequenzierung nicht. Glu ließ sich durch Konvertierung bestätigen.

T20 Lys-Ala-Ala-Ile-Thr-Ala-Glu-Ile-Arg

Das Peptid war durch unvollständige tryptische Spaltung entstanden.

T21 Leu-Ser-Asp-Leu-Ala-Lys

Daß es sich bei der dritten Aminosäure um Asp (und nicht um Asn) handelt, stimmt mit der Wanderung des Peptids auf der Peptidkarte überein.

T22 Val-Glu-Gly-Gly-Val-Val-Asp-Leu-Asn-Thr-Leu-Lys
10

Glu, Asp und Asn wurden durch Konvertierung ermittelt. Als fünfte Aminosäure erschien auf der Polyamid-Platte nicht nur DNS-Val, sondern auch noch ein Fleck, der direkt unter der DNS-Val-Position lag. Er entspricht dem durch unvollständige Hydrolyse entstandenen DNS-Val-Val. Rückspaltung der Thiazolinon-Derivate der 5. und 6. Position bestätigte die Reihenfolge Val-Val.

T24 Val-Ile-Leu-Ala-Gly-Glu-Val-Thr-Thr-Pro-Val-
10
Thr-Val-Arg

Im ersten Abbauschritt erschien neben DNS-Val auf der Polyamidplatte ein zweiter Fleck. Er lag nach der zweiten Dimension auf der DNS-Phe-Position und nach der dritten Dimension direkt unter der DNS-Ile-Position. Dieser Fleck entspricht dem DNS-Val-Ile, dessen Entstehung auf unvollständige Hydrolyse zurückzuführen ist. Als zweite Aminosäure trat auf der Polyamidplatte außer DNS-Ile ein Fleck auf, der nach der zweiten Dimension links neben der DNS-Phe-Position und nach der dritten Dimension links neben der DNS-Ile Position lag. Er entsteht durch unvollständige Hydrolyse von DNS-Ile-Leu. Durch Rückspaltung der Thiazolinon-Derivate der 1., 2. und 3. Position wurde die Reihenfolge Val-Ile-Leu bestätigt.

T26 Val-Thr-Lys

T28 Ala-Ala-Ile-Glu-Ala-Ala-Gly-Gly-Lys

Bei der Sequenzierung beider Peptide, bei denen das Glu von T28 durch Konvertierung bestimmt wurde, traten keine Schwierigkeiten auf.

T29 Ile-Glu-Glu

Das Glu in der 2. und 3. Position wurde durch Konvertierung bestimmt. Als vierte Aminosäure erschien auf der Polyamidplatte DNS-Glu. Es handelt sich dabei offensichtlich um eine Überlappung, da die Bruttoanalyse eindeutig nur zwei Glu ergab.

Bei diesem Peptid T29 handelt es sich um das C-terminale tryptische Peptid des Proteins L15.

T30 Ala-Ala-Ile-Glu-Ala-Ala-Gly-Gly-Lys-Ile-Glu-Glu
10

Bei der Sequenzierung des Peptids, das durch unvollständige enzymatische Spaltung entstand, traten die gleichen Schwierigkeiten auf wie bei T29. Das Lysin, das nicht eindeutig auf der Polyamidplatte identifiziert werden konnte, wurde durch Rückspaltung bestätigt.

Die Peptide T2, T3, T4, T5, T6, T8, T10 und T11 befinden sich im N-terminalen Bereich des Proteins. Ihre Sequenz stimmt mit der durch Sequenatorläufe ermittelten Sequenz mit Ausnahme von drei Positionen überein (s. Diskussion)

4.1.3. Spaltung des Proteins L15 mit Staphylococcus aureus Protease (SP-Peptide)

Primäres Ziel dieser Spaltung war die Gewinnung von SP-Peptiden, deren Sequenzierung Information über die Anordnung der schon sequenzierten tryptischen Peptide liefern sollte. Außerdem sollten noch aus der tryptischen Nachspaltung der SP-Peptide die nicht aus der tryptischen Spaltung des Proteins gewonnenen Peptide isoliert werden. Die SP-Peptide wurden auch mit anderen Enzymen, z.B. Chymotrypsin und Thermolysin, gespalten, um weitere Überlappungen zu erreichen.

4.1.3.1. Isolierung der SP-Peptide

Zur Isolierung der SP-Peptide konnte die Peptidkarten-Technik nicht angewendet werden, weil die Peptide relativ groß und voneinander nicht getrennt waren. Daher wurde das Peptidgemisch auf eine Sephadex-Säule (G50, fine, 150 x 1 cm) gegeben. Dadurch gelang die vollständige Trennung der SP-Peptide. Von den sieben isolierten Peptiden (Abb. 13) waren fünf (SP1, SP3, SP4, SP5 und SP7) völlig sauber, während zwei (SP2 und SP6) mit anderen Peptiden schwach verunreinigt waren.

Daß es sich bei dem ersten Gipfel des Elutionsprofils (Abb. 13) um ungespaltenes L15 handelt, wurde durch Anfertigung von tryptischen Peptidkarten festgestellt. Seine Anwesenheit ist auf unvollständige enzymatische Spaltung zurückzuführen. Die Bruttoanalysen der SP-Peptide sind in der Tab. 5 zusammengestellt. Die etwas niedrigeren oder höheren Aminosäurenwerte, als sie aus der Sequenz des Proteins zu erwarten sind, können wie bei 4.1.2.2. beschrieben erklärt werden.

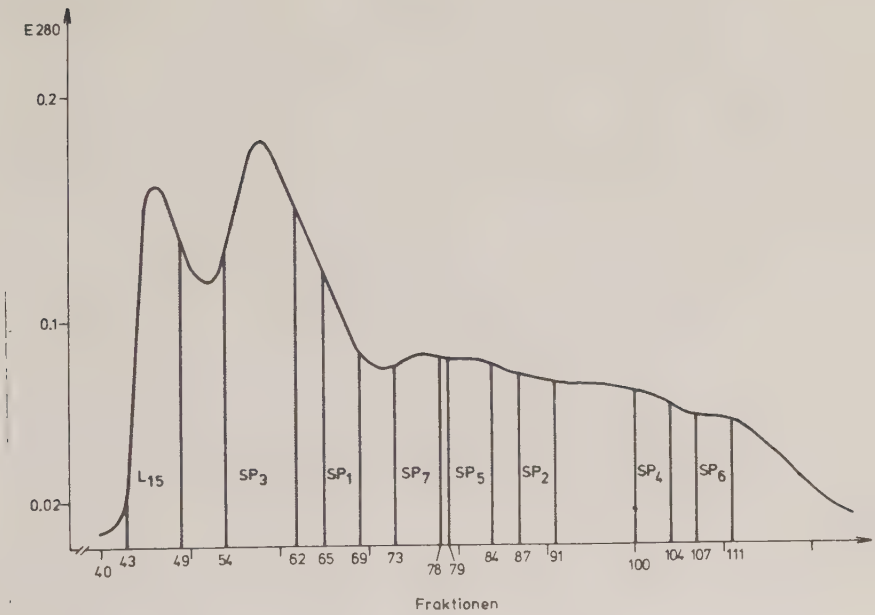


Abb. 13: Trennung der SP-Peptide des Proteins L15 über Sephadex G50 (fine)

Peptide	Asx	Thr	Ser	Glx	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg
SP1	1.29	1.67	4.66	3.24	0.68	14.82	1.81	1.17	0.62	1.oo	3.92		0.86	0.63	5.58	6.61
SP2		1.72	1.12	2.14	1.67	3.24	3.15		0.65	1.oo	1.98	0.71	1.92		1.72	2.83
SP3	1.14	3.61	6.13	5.16	2.72	18.21	5.18	1.oo	1.51	1.93	5.82	0.72	2.81	0.59	7.61	9.73
SP4	1.23		1.o6	1.26			1.24	1.oo		1.o1	1.93				1.2o	0.93
SP5		3.59		2.24	1.oo	3.34	5.21	4.49		1.38	2.o9		0.93		1.83	2.99
SP6				2.44		2.12	2.oo			1.31					1.4o	
SP7		3.62		4.11	1.oo	5.13	6.98	4.46		2.36	2.1o		0.91		2.7o	3.o8

Tab. 5: Bruttoanalysen von SP-Peptiden des Proteins L15

Durch N-Terminus-Bestimmung und Dünnschicht-Chromatographie der eluierten Peptide sowie durch deren Bruttoanalysen wurde geschlossen, daß es sich bei SP1 um den N-terminalen Bereich von SP3 und bei SP5 um den N-terminalen Bereich von SP7 handelt.

4.1.3.2. Spaltung von SP-Peptiden mit Trypsin

Die Peptide SP3 und SP7 wurden mit Trypsin gespalten, um die tryptischen Peptide, die aus der tryptischen Spaltung des Proteins nicht erhalten werden konnten, zu gewinnen.

4.1.3.2.1 Isolierung der Peptide aus der tryptischen Spaltung von SP3

Nach der Spaltung des Peptids SP3 mit Trypsin wurden 20 Peptide (SP3T1 - SP3T20) durch die Peptidkarten-Technik (Abb. 14) isoliert. Die Peptide SP3T1=T1, SP3T7=T7, SP3T9=T9, SP3T12=T12, SP3T13=T13 und SP3T15=T15 traten zum ersten Male auf, während bei den Peptiden SP3T2, SP3T3, SP3T4, SP3T5, SP3T6, SP3T8, SP3T10, SP3T11, SP3T14, SP3T16, SP3T17, SP3T18, SP3T19 und SP3T20 durch N-Terminus-Bestimmung und Bruttoanalyse gezeigt wurde (Tab. 6), daß sie mit den aus der tryptischen Spaltung des Proteins schon bekannten Peptiden T2, T3, T4, T5, T6, T8, T10, T11, T14, T16, T17, T18, T19 und T20 identisch waren. SP3T19 und SP3T20 sind um das Dipeptid Ile-Arg kürzer als die Peptide T19 und T20, weil es sich dabei um das C-terminale Ende von SP3 handelt. Die Anwesenheit von Methionin enthaltenden Peptiden in zwei übereinanderliegenden Flecken (Abb. 14) kann auf eine partielle Oxydation von Methionin zurückgeführt werden.

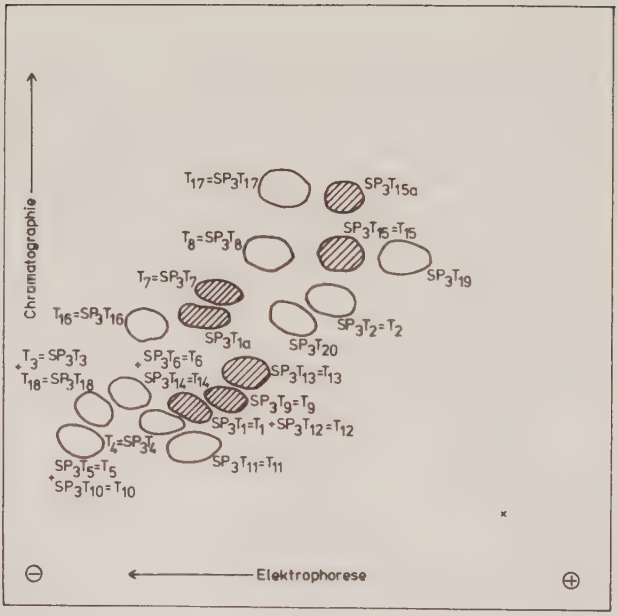


Abb. 14: Karte der Peptide aus der tryptischen Nachspaltung des Peptids SP3

Peptide	Asx	Thr	Ser	Glx	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg
SP3T1									0.68							1.00
SP3T2	1.00	0.92	1.61	1.18	0.92	1.24	1.01				1.67				0.85	
SP3T3																
SP3T18															1.00	
SP3T4						1.34	0.69								1.00	
SP3T5						1.02	1.00								1.59	
SP3T6																
SP3T14																1.00
SP3T7						1.00					0.65					1.08
SP3T8			1.00			3.94				1.00	1.09				0.89	
SP3T9		0.66				2.07										1.00
SP3T10						1.00								0.86	0.92	
SP3T11				1.00		0.74									0.94	
SP3T12			1.12													1.00
SP3T13			0.68			3.09		1.00								0.97
SP3T15				2.04	0.76	2.98			0.66		1.00	0.62	0.79			0.76
SP3T16					0.79						1.00				0.87	0.64
SP3T17		1.00	1.00			1.19							1.55			1.06
SP3T19		1.00		1.38			2.71			0.97						
SP3T20		1.00		1.40			2.86			1.09					0.99	

Tab. 6: Bruttoanalysen der aus der tryptischen Spaltung von SP3 isolierten Peptide

4.1.3.2.2. Isolierung der Peptide aus der tryptischen Spaltung des Peptids SP7

Aus der tryptischen Spaltung von SP7 wurden acht Peptide (SP7T1 - SP7T8) in reiner Form durch die Peptidkarten-Technik (Abb. 15) isoliert. Von den drei insgesamt neu auftretenden Peptiden (SP7T1, SP7T3=T25 und SP7T5=T27) wurde SP7T1 als C-terminales Tripeptid des Peptids T23 identifiziert. Durch Bruttoanalyse (Tab. 7) und N-Terminus-Bestimmung wurde bestimmt, daß die Peptide SP7T2, SP7T4, SP7T6, SP7T7 und SP7T8 mit den aus der tryptischen Spaltung des Proteins gewonnenen Peptiden T24, T26, T28, T29 und T30 identisch sind.

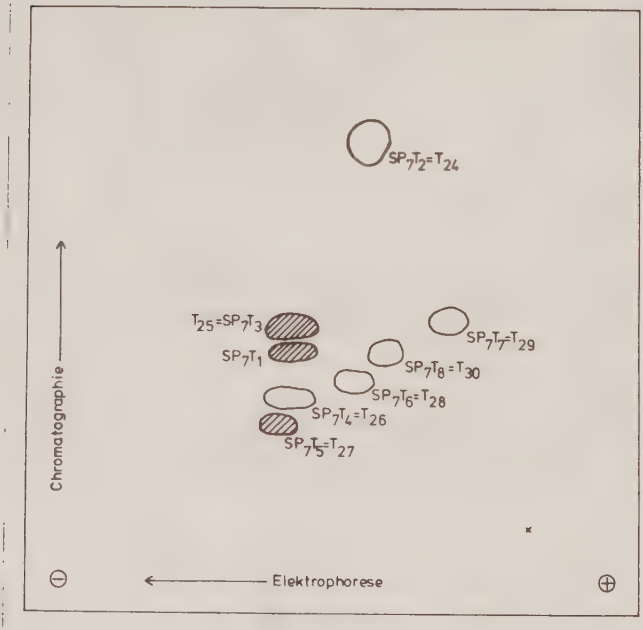


Abb. 15: Karte der Peptide aus der Spaltung des Peptids SP7 mit Trypsin.

Peptide	Asx	Thr	Ser	Glx	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg
SP7T1							1.00						0.86		0.84	
SP7T2		2.67		1.08	0.84	1.22	1.00	3.55		0.67	0.95					0.94
SP7T3						0.99					1.00					1.22
SP7T4		1.00						1.01							0.93	
SP7T5						0.99	1.00									1.02
SP7T6				1.24		2.48	4.30			1.00					1.06	
SP7T7				2.38						1.00						
SP7T8				3.46		2.42	4.20			2.00					1.00	

Tab. 7: Bruttoanalysen der aus der tryptischen Spaltung von SP7 isolierten Peptide

4.1.3.2.3. Sequenzierung der aus der tryptischen Spaltung von SP3 und SP7 gewonnenen Peptide

T1 Met-Arg

T12 Ser-Arg

Die Peptide wurden aus der tryptischen Spaltung von SP3 gewonnen (Abb. 14). Obwohl ihre Sequenz aus der Bruttoanalyse schon durch die Trypsinspezifität geschlossen werden konnte, wurden beide Peptide zusammen sequenziert.

T7 Leu-Gly-Arg

T9 Thr-Gly-Gly-Arg

T13 Ser-Gly-Gly-Gly-Val-Arg

Die Peptide wurden aus der tryptischen Spaltung des Peptids SP3 gewonnen und ohne Probleme sequenziert. Sie konnten in die durch die Sequenatorergebnisse bereits bekannte Sequenz des Proteins eingeordnet werden.

T15 Gly-Phe-Glu-Gly-Gly-Gln-Met-Pro-Leu-Tyr^{10}-Arg

Glu und Gln wurden durch Konvertierung der entsprechenden Thiazolinonderivate bestimmt.

T25 Gly-Leu-Arg

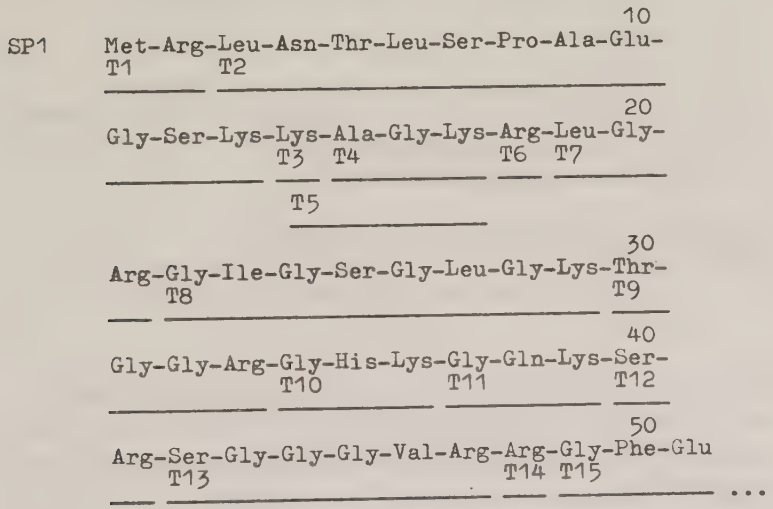
T27 Gly-Ala-Arg

SP7T1 Phe-Ala-Lys

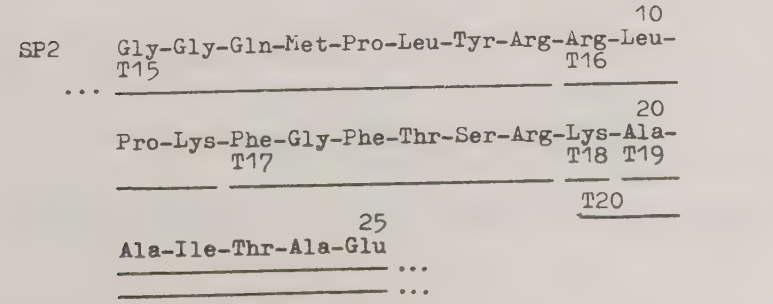
Bei dem Peptid SP7T1 handelt es sich um die C-terminale Region des tryptischen Peptids T23.

Die aus der tryptischen Spaltung von SP3 und SP7 gewonnenen Peptide (T2, T3, T4, T5, T6, T8, T10, T11, T14, T16, T17, T18, T19, T20, T21, T22, T24, T26, T28, T29 und T30) waren aus der tryptischen Spaltung des Proteins bereits bekannt. Sie wurden zur Bestätigung nochmals sequenziert.

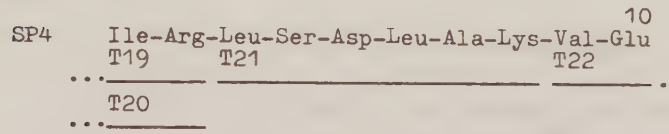
4.1.3.3. Sequenzierung von SP-Peptiden



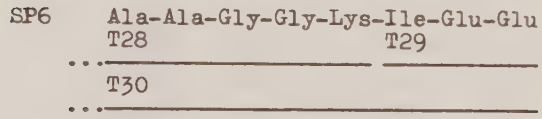
Dieses lange SP-Peptid konnte bis zur Position 23 eindeutig sequenziert werden, wobei die Lysine durch Rückspaltung der entsprechenden Thiazolinonderivate und Glu durch Konvertierung bestätigt wurden. Die damit gewonnene Reihenfolge der Peptide T1-T8 bestätigte zum Teil die vom Sequenator bereits gewonnene Anordnung der Peptide T1-T13.



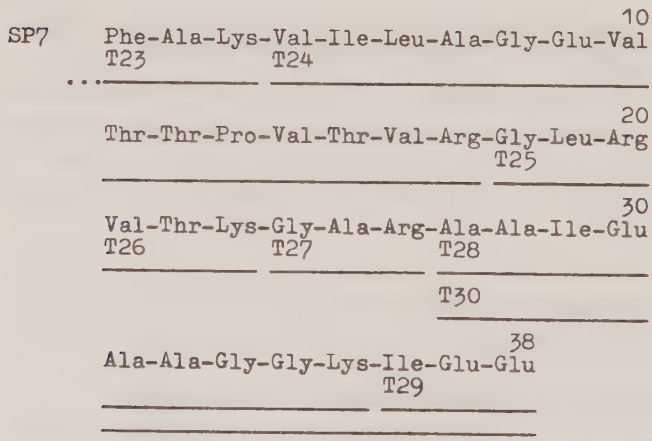
Die Sequenzierung dieses SP-Peptids gelang bis zur Position 23. Dies lieferte Informationen über die Anordnung der Peptide T15-T16-T17-T18-T-19. Eine schwache Kontaminierung des Peptids störte die Sequenzierung nicht. Das Glutamin wurde durch Konvertierung bestimmt.



Die vollständige Sequenzierung dieses SP-Peptids ergab die Reihenfolge der Peptide T20-T21-T22. Asp und Glu wurden durch Konvertierung bestätigt.

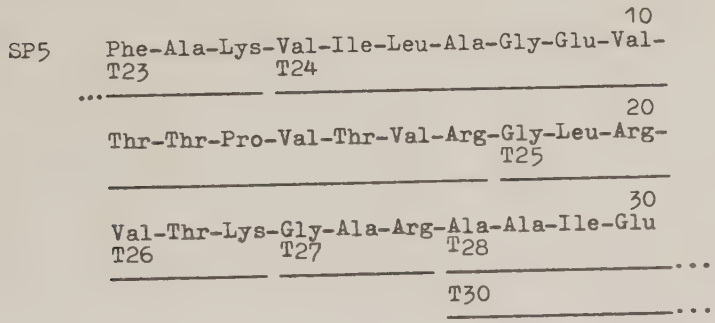


Durch die vollständige Sequenzierung dieses schwach kontaminierten SP-Peptids wurde die Anordnung der Peptide T28-T29 gewonnen. Die Glutaminsäuren wurden durch Konvertierung und das Lysin durch Rückspaltung bestätigt.



Dieses SP-Peptid entstand durch unvollständige enzymati-

sche Spaltung. Aus seiner eindeutig bis zur Position 22 ermittelten Sequenz ergab sich die Zuordnung der Peptide T23-T24-T25-T26.



Die Sequenzierung des Peptids wurde bei der Position 7 abgebrochen, weil das Ziel erreicht war, die Zuordnung der Peptide T23 und T24 zu bestätigen.

4.1.3.4. Spaltung von SP-Peptiden mit α-Chymotrypsin

Das Peptid SP3 wurde mit α-Chymotrypsin gespalten, um Informationen über die Anordnung der tryptischen Peptide innerhalb seines Bereiches (Positionen 1 - 76) zu gewinnen. Die chymotryptische Spaltung des Peptids SP5 wurde durchgeführt, um eine Überlappung, nämlich die Brücke von T26 zu T28, zu beweisen.

4.1.3.4.1. Isolierung der Peptide aus der chymotryptischen Spaltung von SP3

Sechs Peptide (SP3Ch1 - SP3Ch6) wurden aus der Spaltung des Peptids SP3 mit α-Chymotrypsin in reiner Form durch die Peptidkartentechnik (Abb. 16) isoliert. Es wurde durch N-Terminus-Bestimmung und Bruttoanalyse (Tab. 8) festgestellt, daß alle sechs Peptide Teile des schon sequenzierten Peptids SP2 waren.

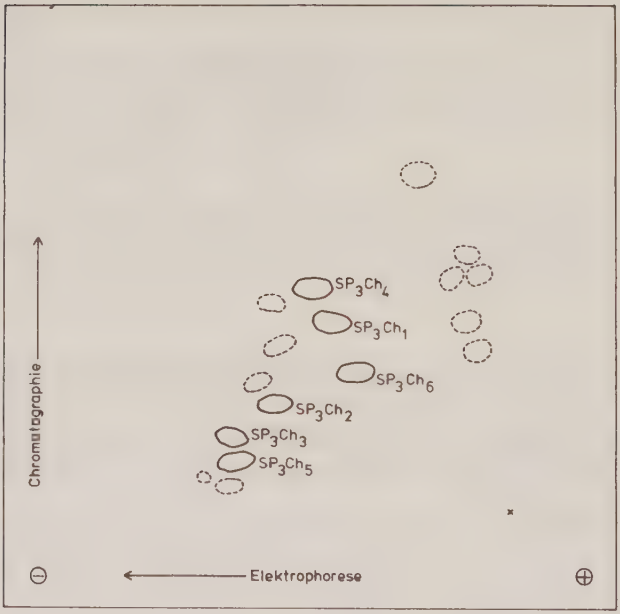


Abb. 16: Karte der Peptide aus der Spaltung von SP3 mit α-Chymotrypsin

Peptide	Asx	Thr	Ser	Glx	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg
SP3Ch1					0.51	1.27					1.00	0.56	1.20		0.62	1.74
SP3Ch2					0.76						1.00	0.79			1.17	1.80
SP3Ch3					0.75						1.00				1.08	2.14
SP3Ch4					0.65	1.31					1.00		1.94		0.79	1.82
SP3Ch5		0.85	0.86												1.00	1.06
SP3Ch6		1.05		1.15			3.04			1.00					0.96	

Tab. 8: Bruttoanalysen von Peptiden aus der chymotryptischen Spaltung des Peptids SP3

Peptide	Asx	Thr	Ser	Glx	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg
SP5Ch1		1.01				1.32	1.12	1.00							1.00	2.00
SP5Ch2				1.28			2.22			1.00						
SP5Ch3		0.97		1.31		1.42	3.14	1.00		0.94					1.12	1.90

Tab. 9: Bruttoanalysen der aus der chymotryptischen Spaltung von SP5 erhaltenen Peptide

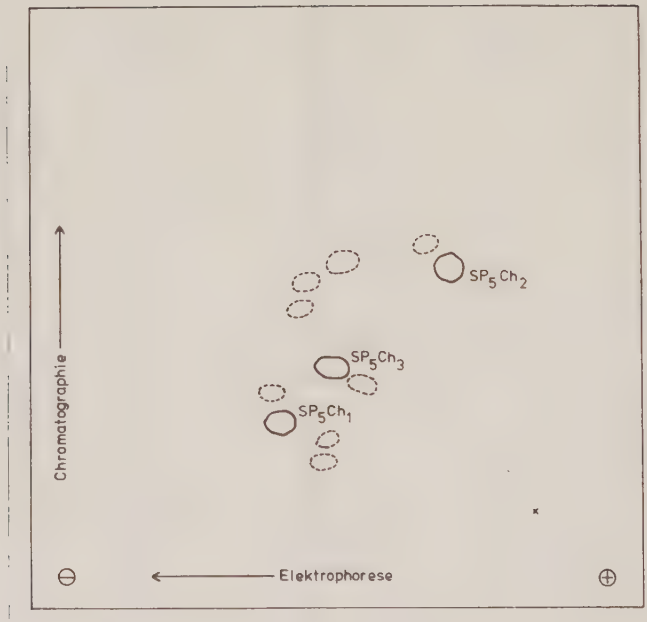
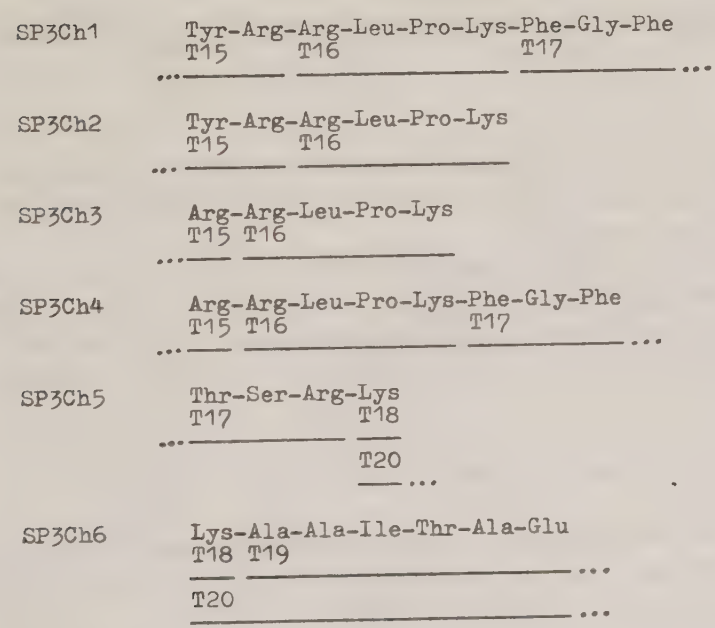


Abb. 17: Karte der nach der Spaltung von SP5 mit α-Chymotrypsin entstandenen Peptide

4.1.3.4.2. Isolierung der Peptide aus der Spaltung von SP5 mit α-Chymotrypsin

Drei Peptide (SP5Ch1 - SP5Ch3) konnten aus der chymotryptischen Spaltung des Peptids SP5 in reiner Form durch die Peptidkartentechnik (Abb. 17) isoliert werden. Ihre Identifizierung erfolgte durch N-Terminus-Bestimmung und Bruttoanalyse (Tab. 9).

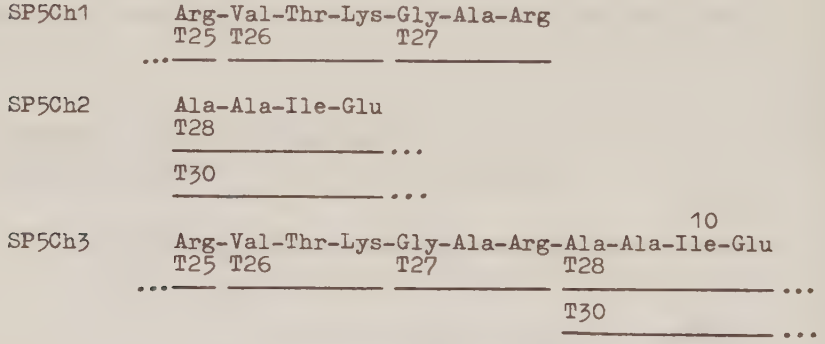
4.1.3.4.3. Sequenzierung der aus der chymotryptischen Spaltung von SP3 und SP5 gewonnenen Peptide



Obwohl bei der Isolierung und Analyse dieser Peptide erkannt wurde, daß sie keine neuen Sequenzbereiche enthalten, wurden sie als Bestätigung sequenziert.

Die Peptide SP3Ch1 und SP3Ch4 entstanden durch unvollständige enzymatische Spaltung, während die Entstehung des

Peptids SP3Ch2 auf unvollständige chymotryptische Spaltung einerseits und auf tryptische Restaktivität im α-Chymotrypsin-Präparat andererseits zurückzuführen ist. Für eine tryptische Restaktivität sprach auch die Entstehung der Peptide SP3Ch3, SP3Ch5 und SP3Ch6.



Durch die vollständige Sequenzierung des Peptids SP3Ch3 wurde die Anordnung der Peptide T26-T27-T28 einwandfrei nachgewiesen.
Die Peptide SP5Ch1 und SP5Ch2 wurden ohne Probleme sequenziert. Ihr Entstehen unterstützte die durch SP3Ch2, SP3Ch3, SP3Ch5 und SP3Ch6 gewonnene Erkenntnis, daß eine tryptische Restaktivität im α-Chymotrypsin-Präparat vorhanden war.

4.1.3.5. Spaltung von SP-Peptiden mit Thermolysin

Dieses SP-Peptid wurde mit Thermolysin gespalten, um Information über die Zuordnung der noch nicht zugeordneten tryptischen Peptide zu erhalten.

4.1.3.5.1. Isolierung der Peptide aus der thermolytischen Spaltung von SP3

Von den 14 Peptiden (SP3Th1 - SP3Th14), die aus der Spaltung von SP3 mit Thermolysin hervorgingen und durch die

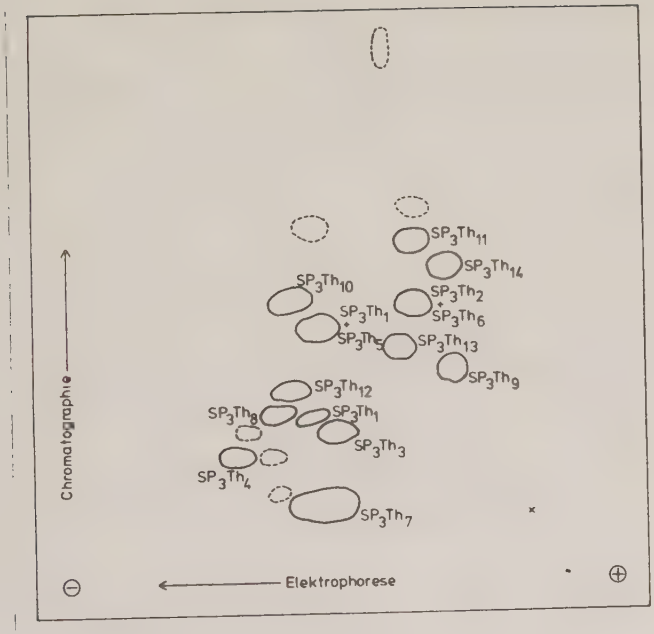


Abb. 18: Karte der nach der Spaltung von SP3 mit Thermolysin entstandenen Peptide

Peptide	Asx	Thr	Ser	Glx	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg
SP3Th1									0.63							1.00
SP3Th2	1.02	1.00									0.95					
SP3Th3			1.98	1.06	0.62	1.30	1.22				1.00				1.80	
SP3Th4						1.22	1.00								0.81	0.89
SP3Th5						2.34					1.00					0.98
SP3Th6			1.00			2.37				0.90						
SP3Th7		0.68	1.91	0.98		8.44					0.78			1.00	2.76	2.11
SP3Th8						1.26		1.00								2.02
SP3Th9				2.03	0.59	2.13			0.99				1.00			
SP3Th10					0.57						1.79	1.00			0.80	2.21
SP3Th11						1.28							1.00			
SP3Th12		1.00	1.15										0.97		1.04	1.24
SP3Th13							2.00									
SP3Th14		1.00		1.34			1.12			0.92						

Tab. 10: Bruttoanalysen der aus der thermolytischen Spaltung von SP3 isolierten Peptide

Peptidkartentechnik (Abb. 18) isoliert wurden, waren SP3Th7 und SP3Th8 besonders wertvoll, da sie die Zuordnung der tryptischen Peptide T8-T15 ergaben.

4.1.3.5.2. Sequenzierung von Peptiden, die nach der thermolytischen Spaltung von SP3 gewonnen wurden

SP3Th1 Met-Arg
T1

SP3Th5 Leu-Gly-Arg-Gly
T7 T8

Die Peptide wurden aus dem gleichen Fleck der Peptidkarte isoliert und zusammen sequenziert.

SP3Th2 Leu-Asn-Thr
T2

SP3Th6 Ile-Gly-Ser-Gly
T8

Diese Peptide wurden gemeinsam aus der Peptidkarte isoliert und sequenziert.

SP3Th3 Leu-Ser-Pro-Ala-Glu-Gly-Ser-Lys-Lys
T2 T3
T5

SP3Th12 Phe-Thr-Ser-Arg-Lys
T17 T18
T20

Beide Peptide wurden zur Bestätigung bereits bekannter Sequenzen sequenziert. Ihre Entstehung ist wahrscheinlich auf eine Verunreinigung des Thermolysin-Präparates mit Trypsin zurückzuführen.

SP3Th7

```
                                                        10
Leu-Gly-Lys-Thr-Gly-Gly-Arg-Gly-His-Lys-
T8          T9              T10
...———————— ——————————— ——————————

                                                    19
Gly-Gln-Lys-Ser-Arg-Ser-Gly-Gly-Gly
T11         T12     T13
————————— ——————— ——————————————...
```

Zur Isolierung dieses Peptids in solcher Menge, die zur vollständigen Sequenzierung ausreichte, mußten relativ große Mengen (mehr als 40 nmol) angesetzt werden, weil das Peptid durch Extraktion in die organische Phase teilweise verloren ging.

Die Sequenz konnte bis zur letzten Aminosäure eindeutig ermittelt werden. Daraus erfolgte die Zuordnung der Peptide T8-T9-T10-T11-T12-T13, und die vom Sequenator bereits gewonnene Information über die Reihenfolge der Peptide T1-T13 wurde völlig bestätigt.

SP3Th8

```
Val-Arg-Arg-Gly
T13     T14 T15
...———————— ——— ———...
```

Die Sequenzierung dieses Peptids ergab die Anordnung der Peptide T13-T14-T15, und damit war die Reihenfolge aller tryptischen Peptide im Bereich des Peptids SP3 festgelegt.

Mit den bisher dargestellten experimentellen Ergebnissen war die Sequenz des Proteins L15 im N-terminalen Bereich, der 96 Aminosäuren enthielt, und im C-terminalen Bereich, der sich aus 38 Aminosäuren zusammensetzte (s. Abb. 24), eindeutig ermittelt. Zur vollständigen Sequenzermittlung des Proteins mußte noch die Brücke zwischen diesen beiden Bereichen gefunden werden.

4.1.4. Tryptische Spaltung des Proteins nach Lysin-Blockierung mit Citraconsäureanhydrid

Nach der bereits ermittelten Sequenz des Proteins (siehe Abb. 24) könnte die Brücke von dem 96 Aminosäuren enthal-

tenden N-terminalen Bereich zu dem 38 Aminosäuren enthaltenden C-terminalen Bereich ein Teil eines langen Peptids sein, das nach Lysinblockierung und anschließender tryptischer Spaltung zu erwarten war. Auf Grund dieser Überlegung wurde das Protein nach Blockierung der Lysin-Reste mit Citraconsäureanhydrid mit Trypsin gespalten.

4.1.4.1. Isolierung der Lysin-blockierten tryptischen Peptide

Die angefertigten analytischen Peptidkarten ergaben eine erste Information über die Existenz eines sehr langen Lysin-blockierten Peptids, zu dessen Isolierung im präparativen Maßstab sich die Gelfiltration als eine geeignete Methode anbot. Tatsächlich wurde dieses Peptid durch Sephadex G50 (fine) Gelfiltration (Abb. 19) in reiner Form isoliert. Die restlichen Lysin-blockierten tryptischen Peptide wurden zunächst als Gruppen gewonnen und weiter durch die Peptidkartentechnik und präparative Dünnschichtchromatographie (Abb. 20, 21, 22) voneinander getrennt.

Die Isolierung und nähere Analyse des Peptids LBT10 ergaben die gewünschte Information über die Zuordnung der N- bzw. C-terminalen Regionen.

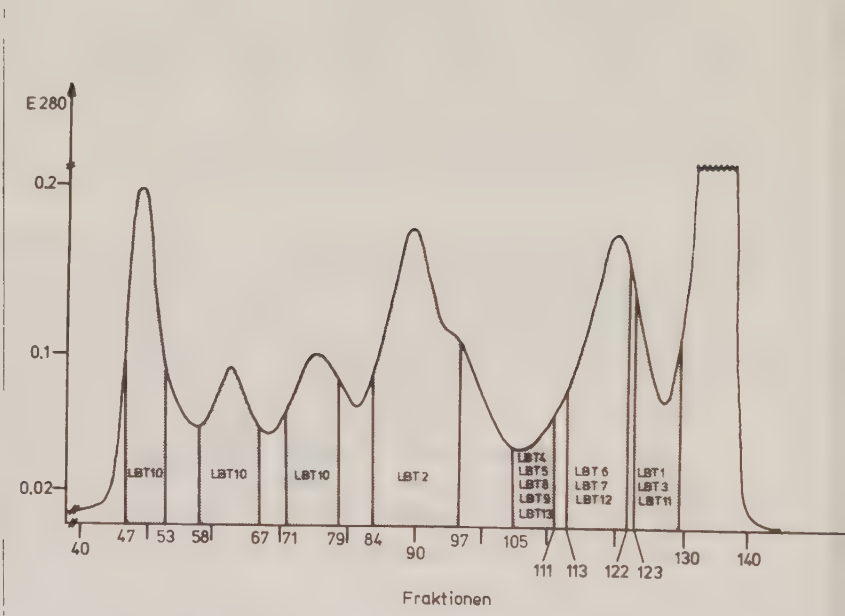


Abb. 19: Trennung der Lysin-blockierten tryptischen Peptide über Sephadex G50 (fine)

Peptide	Asx	Thr	Ser	Glx	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg
LBT1									0.71							1.00
LBT2	1.15	1.00	1.81	1.23	1.14	2.13	2.14				1.83				2.80	0.89
LBT3						1.11					1.01					1.00
LBT4		1.00	0.78			6.09				1.03	0.90				0.93	1.00
LBT5			0.75	0.99		2.03								1.00	1.91	0.90
LBT6			0.72			3.06		1.00								1.93
LBT7				2.04	1.02	3.08			0.64		1.00	0.54	0.91			0.91
LBT8		0.87	0.82		0.91	1.04					1.00		1.71		0.87	1.81
LBT9		1.01		0.98			3.03			1.98					0.91	1.00
LBT10	3.75	3.52	1.38	4.37	1.00	4.38	4.70	5.92		4.25	4.42		0.84		2.51	0.93
LBT11						1.03					1.07					1.00
LBT12		1.00				1.21	1.14	0.99							0.82	1.23
LBT13				2.93		2.19	3.98			2.00					0.89	

Tab. 11: Bruttoanalysen der Lysin-blockierten tryptischen Peptide von L15

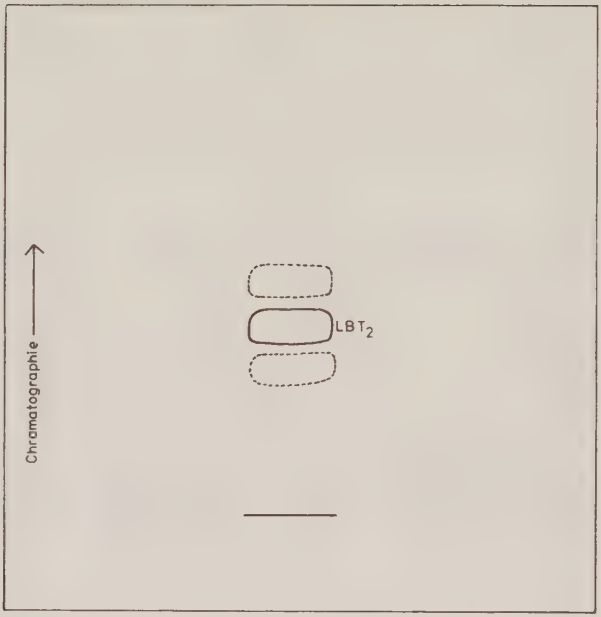


Abb. 20: Dünnschichtchromatographie von Lysin-blockierten tryptischen Peptiden, die über Sephadex G50 (fine) (s. Abb.19) vorgetrennt waren

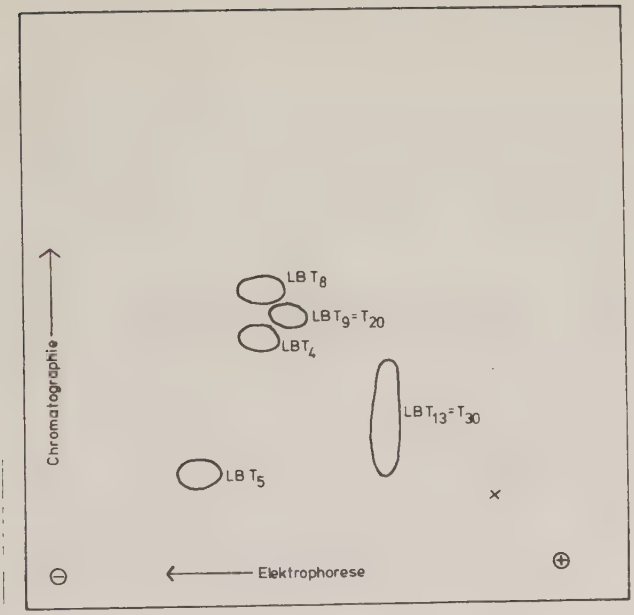


Abb. 21: Karte der Lysin-blockierten tryptischen Peptide, die über Sephadex G50 (fine) (s. Abb.19) vorgetrennt waren.

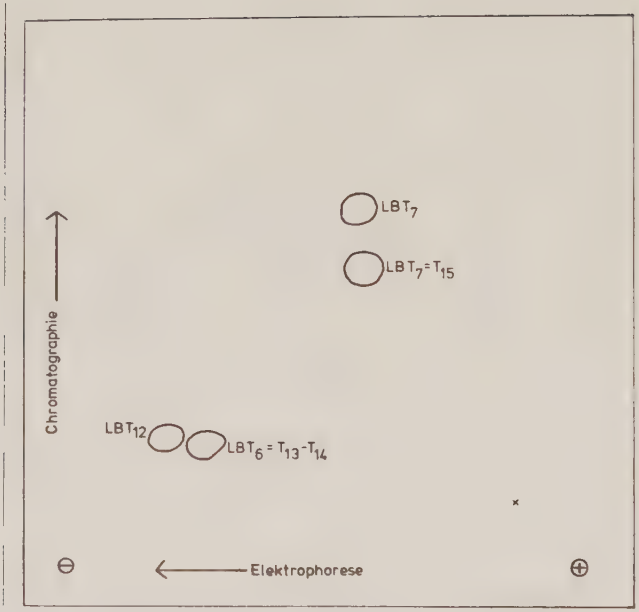


Abb. 22: Karte der über Sephadex G50 (fine) (s. Abb.19) erhaltenen Lysin-blockierten tryptischen Peptide.

4.1.4.2. Sequenzierung der Lysin-blockierten tryptischen Peptide

LBT1 Met-Arg
T1

LBT3 Leu-Gly-Arg
T7

LBT11 Gly-Leu-Arg
T25

Die Peptide wurden zusammen isoliert (s. Abb. 19) und zur Bestätigung der bereits ermittelten Sequenz von L15 sequenziert.

LBT2 Leu-Asn-Thr-Leu-Ser-Pro-Ala-Glu-Gly-Ser
T2 (10)

Lys-Lys-Ala-Gly-Lys-Arg
T3 T4 T6 (16)
T5

Das Peptid konnte in sequenzierbarer Form erst nach Dünnschichtchromatographie (s. Abb. 20) isoliert werden. Es wurde zur Bestätigung sequenziert.

LBT4 Gly-Ile-Gly-Ser-Gly-Leu-Gly-Lys-Thr-Gly-Gly-Arg
T8 T9 (10)

LBT5 Gly-His-Lys-Gly-Gln-Lys-Ser-Arg
T10 T11 T12

LBT6 Ser-Gly-Gly-Gly-Val-Arg-Arg
T13 T14

LBT7 Gly-Phe-Glu-Gly-Gly-Gln-Met-Pro-Leu-Tyr-Arg
T15 (10)

LBT8 Arg-Leu-Pro-Lys-Phe-Gly-Phe-Thr-Ser-Arg
T16 T17

LBT9 Lys-Ala-Ala-Ile-Thr-Ala-Glu-Ile-Arg
T18 T19
T20

Zur Bestätigung der bereits bekannten Sequenz von L15 wurden diese Peptide sequenziert.

LBT10 Leu-Ser-Asp-Leu-Ala-Lys-Val-Glu-Gly-Gly-
T21 T22
Val-Val-Asp-Leu-Asn-Thr-Leu-Lys-Ala-Ala-
T23
Asn-Ile-Ile-Gly-Ile-Gln-Ile-Glu-Phe-Ala-
Lys-Val-Ile-Leu-Ala-Gly-Glu-Val-Thr-Thr-
T24
Pro-Val-Thr-Val-Arg

Dieses Peptid, das als einziges Lysin-blockiertes tryptisches Peptid in reiner Form über Sephadex G50 (fine) isoliert wurde (s. Abb. 19), wurde bis zur Position 29 eindeutig sequenziert. Die Positionen von Glu und Asp bzw. der Amide wurden durch Konvertierung der entsprechenden Thiazolinonderivate bestimmt. Die Reihenfolge Ile-Ile (Pos. 22-23) wurde durch Rückspaltung bestätigt. Durch die damit gewonnene Zuordnung der Peptide T22-T23 wurde die Verbindung zwischen dem 96 Aminosäuren enthaltenden N-terminalen Bereich und dem 38 Aminosäuren enthaltenden C-terminalen Bereich (s. Abb. 24) erhalten. Dabei wurde erstmals festgestellt, daß es sich bei dem gesuchten Stück nur um ein einziges tryptisches Peptid (T23) handelt. Damit konnte die Sequenz des Proteins L15, dessen jede ein-

zelne Position, außer dem Bereich von T23, mindestens zweimal bestätigt war, vollständig ermittelt werden. Sie ist in Abb. 24 zusammen mit allen aus den verschiedenen enzymatischen Spaltungen isolierten Peptiden dargestellt.

LBT12 Val-Thr-Lys-Gly-Ala-Arg
T26 T27

10
LBT13 Ala-Ala-Ile-Glu-Ala-Ala-Gly-Gly-Lys-Ile-Glu-Glu
T28 T29
T30

Diese Peptide wurden zur Bestätigung sequenziert.

4.1.4.3. Spaltung von LBT10 mit Trypsin

Um das Peptid T23 isoliert zu gewinnen, wurde das Peptid LBT10 mit Trypsin gespalten.

4.1.4.3.1. Isolierung der nach der tryptischen Spaltung von LBT10 entstandenen Peptide

Es wurden vier Peptide isoliert. Durch die Bestimmung des N-Terminus und durch Bruttoanalyse wurde festgestellt, daß es sich um folgende Peptide handelt: LBT10T1 = T21; LBT10T2 = T22; LBT10T3 = T23 und LBT10T4 = T24. Das gesuchte Peptid T23, das etwas mit Glycin verunreinigt war, konnte erstmals isoliert werden.

4.1.4.3.2. Sequenzierung von LBTT-Peptiden

10
T23 Ala-Ala-Asn-Ile-Ile-Gly-Ile-Gln-Ile-Glu-Phe-Ala-Lys

Obwohl die Sequenz dieses Peptids durch das Peptid LBT10 bereits bekannt war, wurde T23 zur Bestätigung sequenziert. Die erwähnte leichte Glycin-Kontaminierung machte die Auswertung der ersten Aminosäure auf der Polyamidplatte etwas schwierig. Durch Rückspaltung und Konvertierung wurde Alanin als N-terminale Aminosäure einwandfrei nachgewiesen. Die Ermittlung

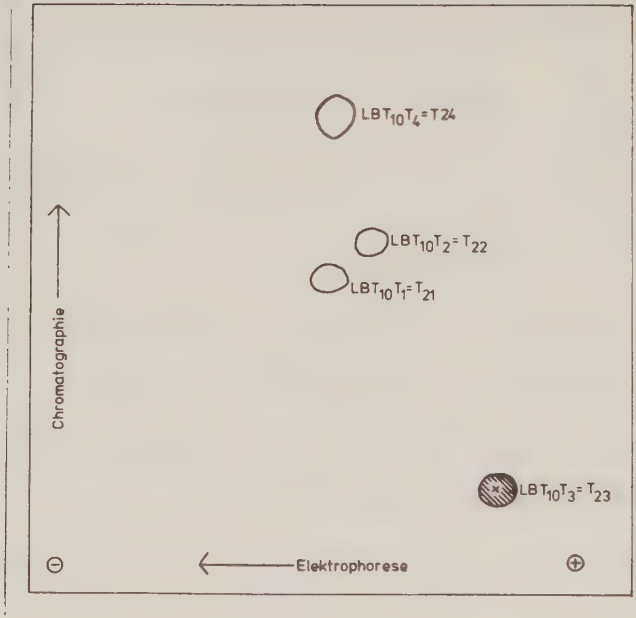


Abb. 23: Karte der Peptide aus der tryptischen Spaltung von LBT10.

der restlichen Sequenz lief ohne Probleme ab, wobei Glu, Gln und Asn durch Konvertierung bestimmt wurden und die Reihenfolge Ile-Ile (Pos. 4-5) durch Rückspaltung bestätigt wurde.

Peptide	Asx	Thr	Ser	Glx	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg
LBT10T1	1.00		1.02				1.04				1.60				0.88	
LBT10T2	1.75	0.87		1.04		2.38		2.65			2.00				1.00	
LBT10T3	1.35			2.29		1.89	3.30			3.63			0.82		1.00	
LBT10T4		3.13		1.04	0.61	1.00	1.00	3.17		0.83	1.15					0.85

Tab. 12: Bruttoanalysen der aus der tryptischen Spaltung von LBT10 isolierten Peptide.

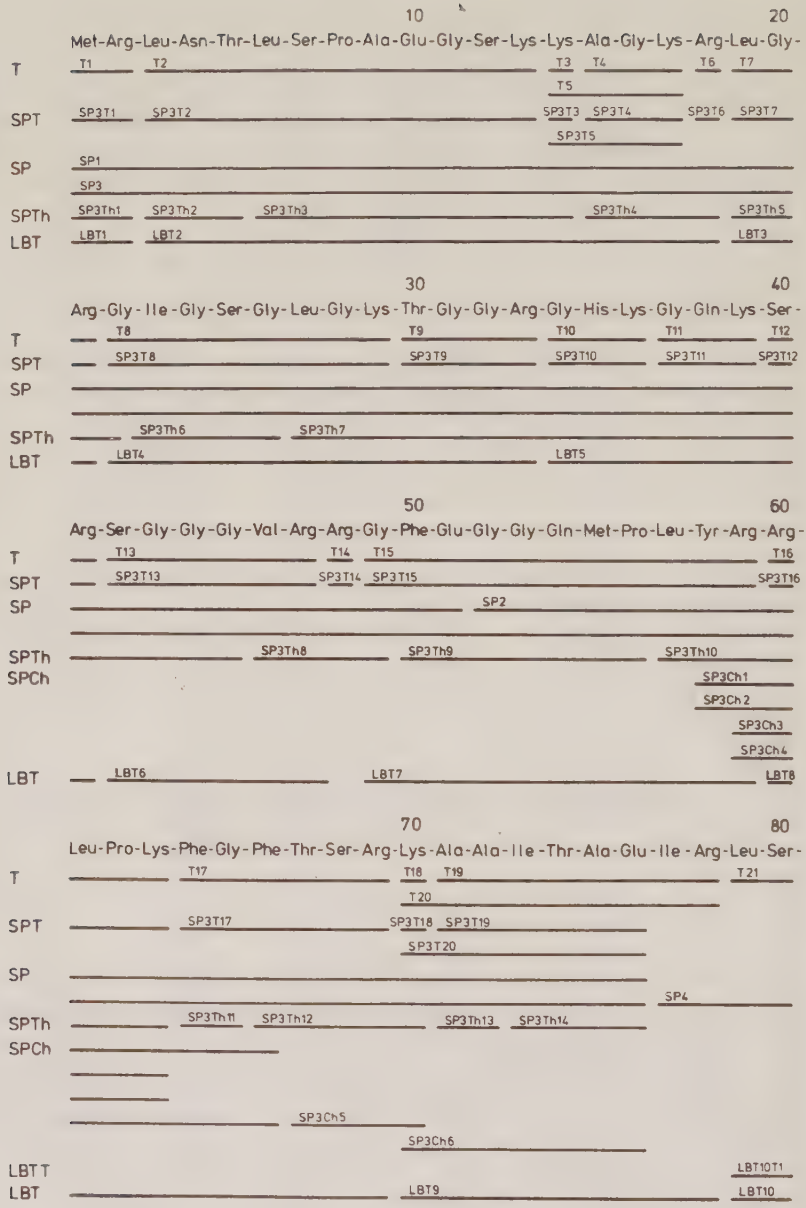
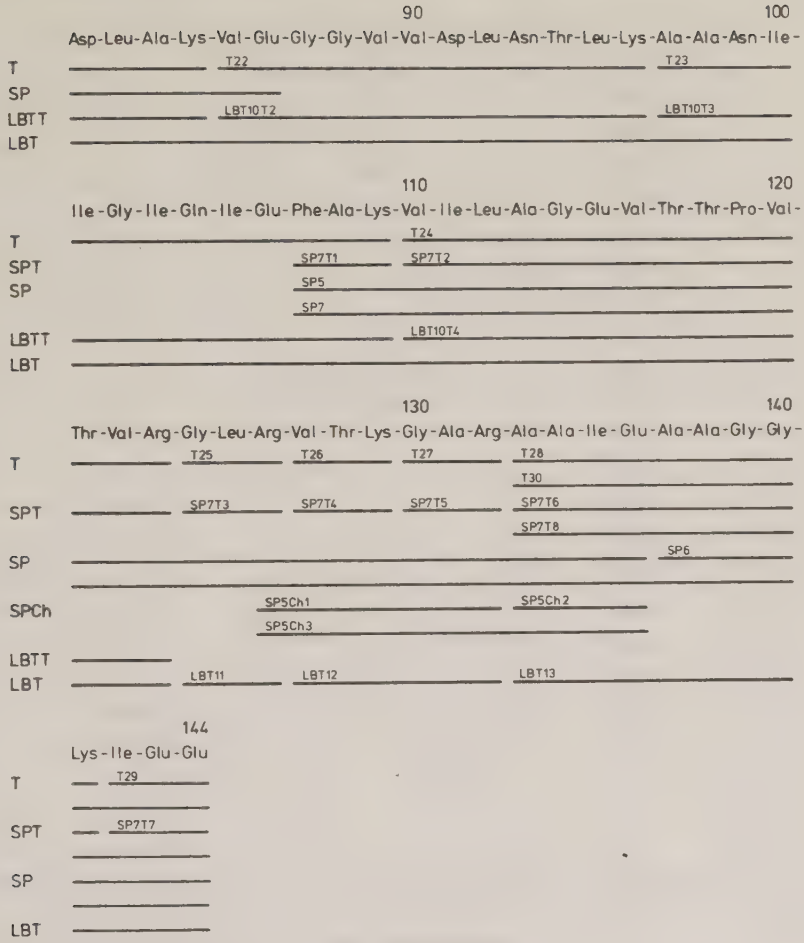


Abb. 24: Primärstruktur des ribosomalen Proteins L15



Fortsetzung Abb. 24:

T, tryptische Peptide; LBT, Lysin-blockierte tryptische Peptide; LBTT, tryptische Spaltung von LBT-Peptiden; SP, Peptide aus der Spaltung des Proteins mit Staphylococcus aureus Protease; SPCh, chymotryptische Spaltung von SP-Peptiden; SPT, tryptische Spaltung von SP-Peptiden; SPTh, thermolytische Spaltung von SP-Peptiden.

Aminosäuren	Bruttoanalyse	Aminosäurenzusammensetzung aus der Sequenz
Asx	5.4	
Asn		3
Asp		2
Thr	8.2	9
Ser	6.5	7
Glx	12.3	
Gln		3
Glu		9
Pro	4.1	4
Gly	26.5	26
Ala	14.8	15
Val	8.2	9
Met	1.7	2
Ile	9.1	10
Leu	11.6	12
Tyr	0.7	1
Phe	3.6	4
His	1.0	1
Lys	12.5	13
Arg	13.7	14
		144

Tab. 13: Aminosäurenzusammensetzung des Proteins L15.

Die Abweichung der Bruttoanalysen-Werte von den Sequenzwerten erklärt sich durch Zerstörung von empfindlichen Aminosäuren während der Hydrolyse bzw. durch unvollständige Hydrolyse bestimmter Peptidbindungen (s. Abschnitt 4.1.2.2.).

4.1.5. Homologe Regionen

Zum Vergleich möglicher Strukturverwandtschaft zwischen dem Protein L15 und anderen (bereits sequenzierten) Proteinen aus dem E.coli Ribosom wurden die Sequenzhomologien durch ein EDV-Programm ermittelt (Tab. 12). Zahl und Länge der identischen Peptide lassen sich durch eine Zufallsverteilung erklären (Dzionara und Wittmann-Liebold, 1976). Es besteht demnach keine signifikante Strukturverwandtschaft zwischen dem Protein L15 und einem anderen Protein aus dem E.coli Ribosom.

Peptid	Protein	Position	Protein	Position
Leu-Asn-Thr-Leu	L15	3- 6	L15	92- 95
Glu-Gly-Ser-Lys-Lys	L15	10- 14	L19	33- 37
Lys-Arg-Leu-Gly	L15	17- 20	L27	18- 21
Thr-Gly-Gly-Arg	L15	30- 33	L31	53- 56
Arg-Leu-Pro-Lys	L15	60- 63	L30	15- 18
Ala-Ala-Ile-Thr	L15	71- 74	S6	27- 30
Ile-Thr-Ala-Glu	L15	73- 76	L6	120-123
Arg-Leu-Ser-Asp	L15	78- 81	S4	46- 49
Lys-Val-Glu-Gly	L15	84- 87	S8	49- 52
Leu-Lys-Ala-Ala	L15	95- 98	L7/L12	58- 61
Glu-Phe-Ala-Lys	L15	106-109	L10	98-101
Pro-Val-Thr-Val	L15	119-122	L3	23- 26
Thr-Val-Asp-Glu	L15	121-124	S12	96- 99
Arg-Gly-Leu-Arg	L15	123-126	S13	86- 89
Ala-Ile-Glu-Ala	L15	134-137	S20	37- 40
Ile-Glu-Ala-Ala	L15	135-138	L16	46- 49

Tab. 14: Peptide von L15, deren Sequenz auch in anderen ribosomalen Proteinen aus E.coli vorkommt.

4.1.6. Aussagen über die Sekundärstruktur von L15

Durch die Methoden von Burgess et al. (1974), Chou und Fasman (1974a,b), Nagano (1977) sowie Robson und Suzuki (1976) kann die Sekundärstruktur von Proteinen anhand der Aminosäurensequenz vorausgesagt werden. Als Grundlage dienen Proteine, deren Primärstruktur bekannt ist und deren Sekundär- und Tertiärstruktur röntgenographisch aufgeklärt wurde. Dabei werden die Aminosäuren hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit, mit der sie eine -Helix, ß-Struktur oder "Zufallsstruktur" (random coil) ausbilden, katalogisiert. Durch Anwendung dieser empirischen Werte bei den Aminosäuren in der Sequenz von L15 konnten Aussagen über eine wahrscheinliche Sekundärstruktur gemacht werden (Dzionara, Robinson und Wittmann-Liebold, 1977). Sie sind in Abb. 24a dargestellt.

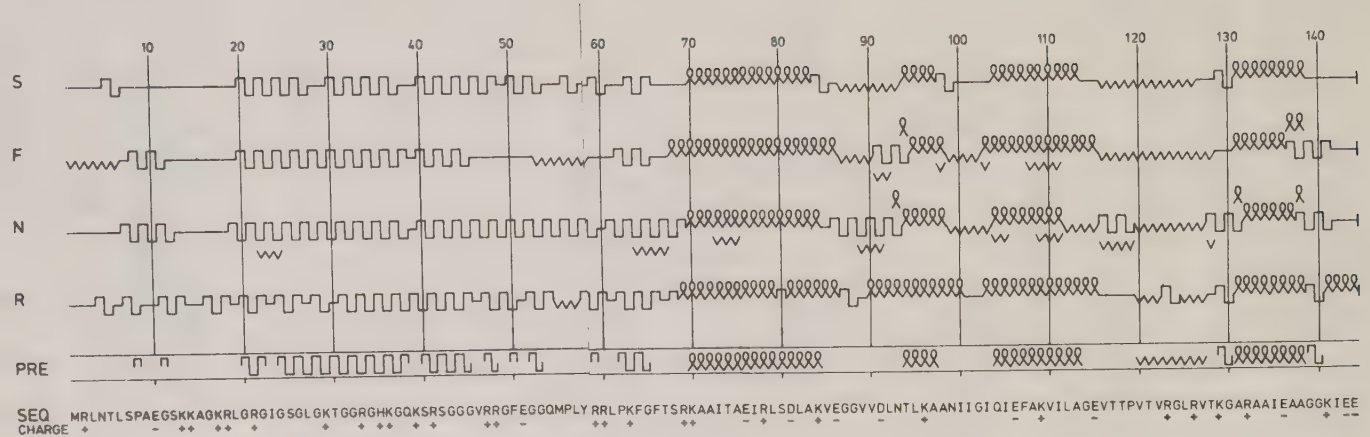


Abb. 24a: Vorhersage der Sekundärstruktur von L15 nach vier verschiedenen Methoden: S) Burgess et al. (1974); F) Chou und Fasman (1974a,b) und Chou et al. (1975); N) Nagano (1977); R) Robson und Suzuki (1976). PRE) wahrscheinliche Sekundärstruktur von L15, die sich aus der Übereinstimmung der Ergebnisse von mindestens 3 Methoden ergeben hat. (ωω) Helix; (ωω) ß-Struktur; (ωω) Windungen der Proteinkette; (——) Zufallsstruktur

4.2. Isolierung des ribosomalen Proteins S1, Fragmentierung dieses Proteins mit BrCN sowie Isolierung und Charakterisierung von BrCN-Fragmenten

4.2.1. Isolierung des ribosomalen Proteins S1

Wie im Abschnitt 3.2.1.3.5. erwähnt, wurden zwei S1-Isolierungen durchgeführt.

4.2.1.1. Erste Präparation des Proteins S1

Diese S1-Isolierung erfolgte nach dem Schema, das in der Abbildung 25 dargestellt ist. Beim Schritt A wurden die ribosomalen Proteine (300 ml) mit 300 ml 4 M LiCl/8 M Harnstoff-Lösung, wie im Abschnitt 3.2.1.3.2. beschrieben, extrahiert. Es erfolgte der Schritt B, bei dem die ribosomalen Proteine mit 1800 ml Aceton gefällt wurden. Dadurch wurden der Harnstoff und das Salz entfernt und die Proteine konzentriert. Beim Schritt C wurden die mit Aceton gefällten Proteine in 300 ml Puffer IV aufgenommen und ungelöste Aggregate abzentrifugiert. Beim Schritt D wurden die in ca. 300 ml Puffer IV gelösten ribosomalen Proteine zur Trennung der sauren von den basischen Proteinen auf eine DEAE-Cellulose-Säule (3 x 25 cm) aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte erst mit 400 ml Puffer IV und dann mit 400 ml Puffer IV/0.2 M NaCl. Das Elutionsprofil ist in der Abbildung 26 dargestellt. Bei dem Schritt E wurden die ribosomalen Proteine in einem Volumen von ca. 20 ml zur Abtrennung der sauren hochmolekularen von den sauren niedermolekularen Proteinen auf eine Ultrogel-Säule (3 x 50 cm) aufgetragen und mit 500 ml Puffer IV eluiert. Das Elutionsdiagramm ist in Abbildung 27 wiedergegeben.

Die Trennung der hochmolekularen sauren Proteine (Gipfel I, Abb.27) geschah durch eine DEAE-Cellulose-Säule (2 x 50 cm) mit folgendem Gradienten: 400 ml Puffer IV - 400 ml Puffer IV/0.2 M NaCl (Schritt F). Das Elutionsprofil ist in

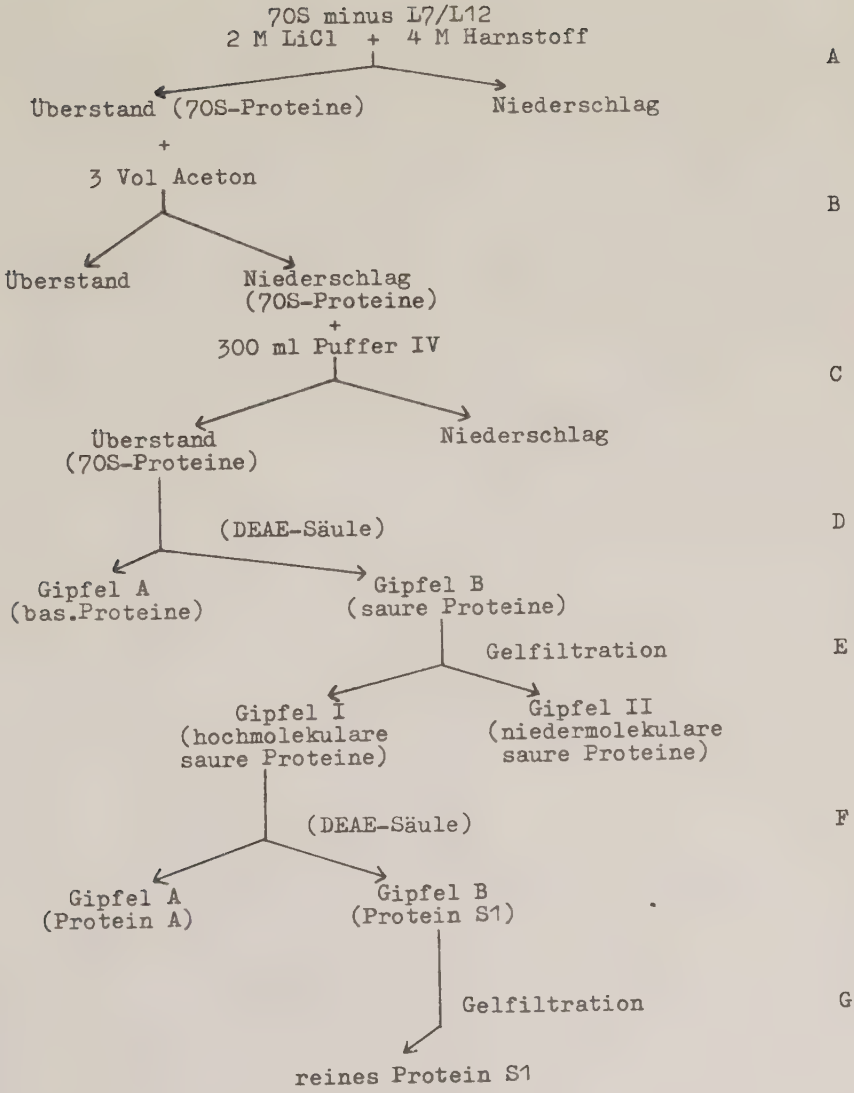


Abb. 25: Schematische Darstellung der Isolierung des Proteins S1.

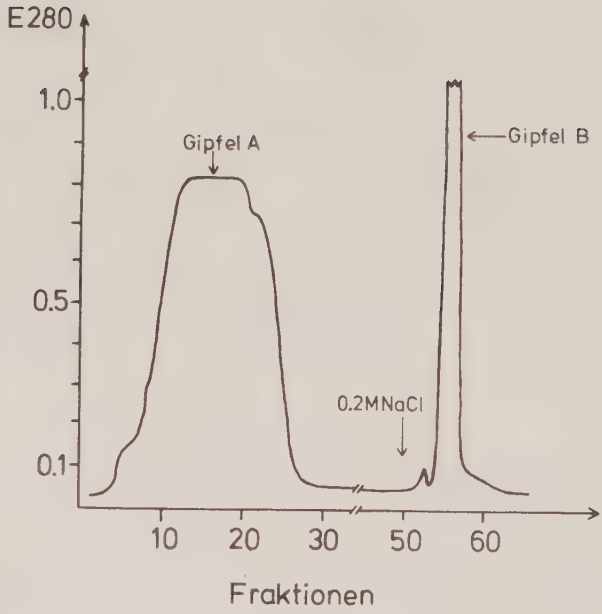


Abb. 26: Vorfraktionierung der 70S-Proteine an DEAE-Cellulose (DE 52). Gipfel A: basische Proteine; Gipfel B: saure Proteine

der Abbildung 28 dargestellt. Der Gipfel B enthielt, wie durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nachgewiesen wurde, das Protein S1, das aber mit Protein A und einem unbekannten Protein etwas verunreinigt war. Die weitere Reinigung des isolierten Proteins S1 erfolgte im Schritt G. Dabei wurde das isolierte Protein in einem Volumen von ca. 5 ml auf eine G150 Sephadex-Säule (2 x 200 cm) aufgetragen und mit 800 ml Puffer IV eluiert. Das Ergebnis ist in der Abbildung 29 dargestellt. Durch diese Prozedur wurde S1 in einem Reinheitsgrad von über 95 % gewonnen. Die Ausbeute betrug ca. 15 mg S1 pro ca. 3 g 70S Ribosomen.

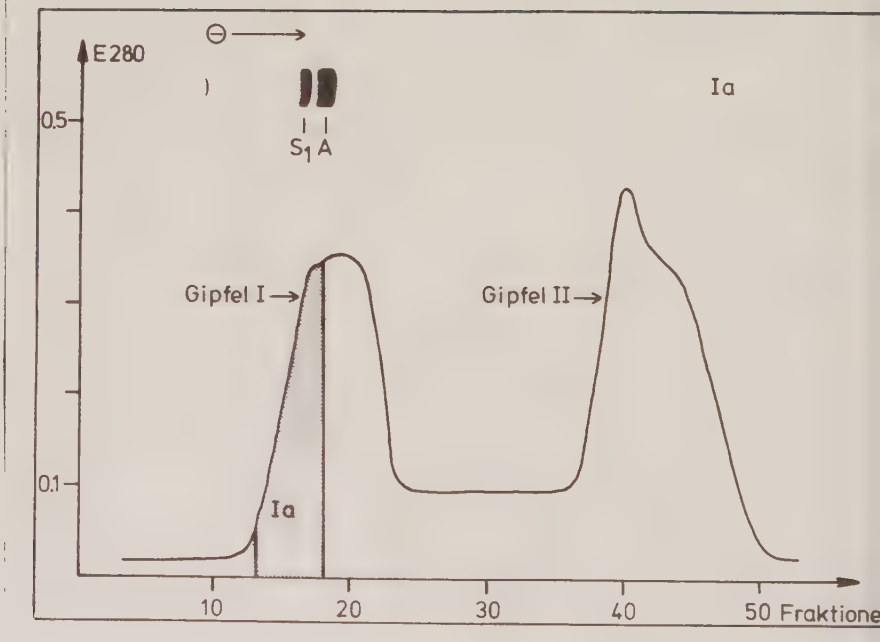


Abb. 27: Trennung der sauren hochmolekularen von den niedermolekularen ribosomalen Proteinen über Ultrogel (ACA 34).
Gipfel I: hochmolekulare saure Proteine;
Gipfel II: niedermolekulare saure Proteine.

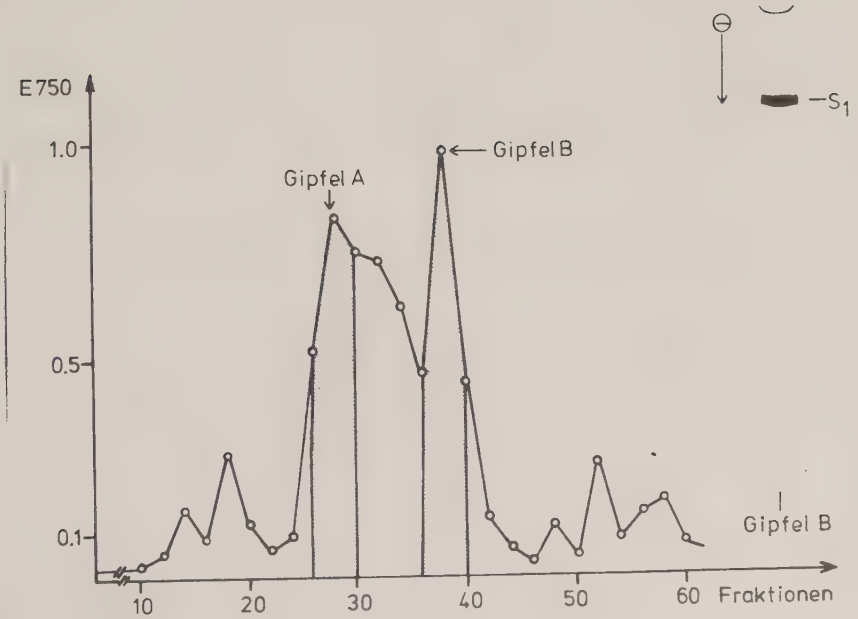


Abb. 28: Trennung der hochmolekularen sauren Proteine an DEAE-Cellulose (DE 52).
Gipfel A: Protein A;
Gipfel B: Protein S1.

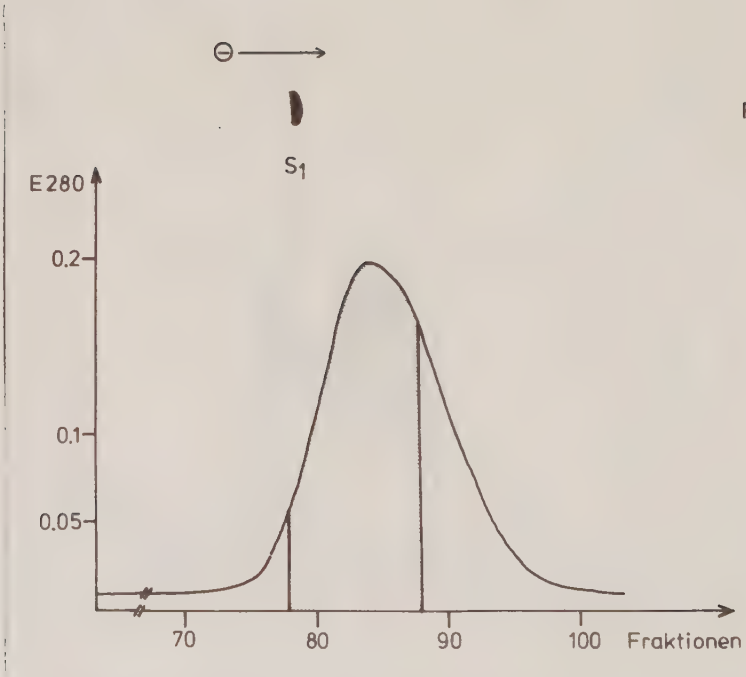


Abb. 29: Reinigung des isolierten Proteins S1 über Sephadex G150 (fine).

4.2.1.2. Zweite Präparation des Proteins S1

Diese Isolierung von S1 war mit der im Abschnitt 4.2.1.1. beschriebenen Isolierung bis zum Ende des Schrittes E (s. Abb. 25) identisch. Beim Schritt F der zweiten Präparation wurde nicht der gesamte Gipfel I (s. Abb. 27), wie beim Schritt F der ersten Präparation, auf die DEAE-Cellulose-Säule aufgetragen, sondern nur der Teil Ia. Er enthielt, wie durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nachgewiesen wurde, nur die beiden Proteine S1 und A. Die Elution der Proteine S1 und A erfolgte mit einem Gradienten aus 400 ml Puffer IV/0.01 M NaCl und 400 ml Puffer IV/0.14 M NaCl und nicht mit dem Gradienten, mit dem die hochmolekularen sauren Proteine bei der ersten Präparation eluiert wurden. Das Elutionsprofil ist in der Abbildung 30 dargestellt. Der Gipfel B enthielt, wie die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nachwies, das Protein S1 in einem Reinheitsgrad von über 98 %. Die Ausbeute betrug ca. 7 mg.

Von dem isolierten S1 wurde eine zweidimensionale Elektrophorese durchgeführt, um seine Reinheit zu überprüfen (s. Abb. 31).
Da bei der Durchführung der zweiten S1-Isolierung die lange Sephadex-Säule nicht benutzt wurde, konnte S1 schneller gewonnen werden als bei der ersten Präparation. Außerdem wurden Verluste an Material vermieden, die bei der ersten Präparation durch die Sephadex-Säule verursacht wurden.

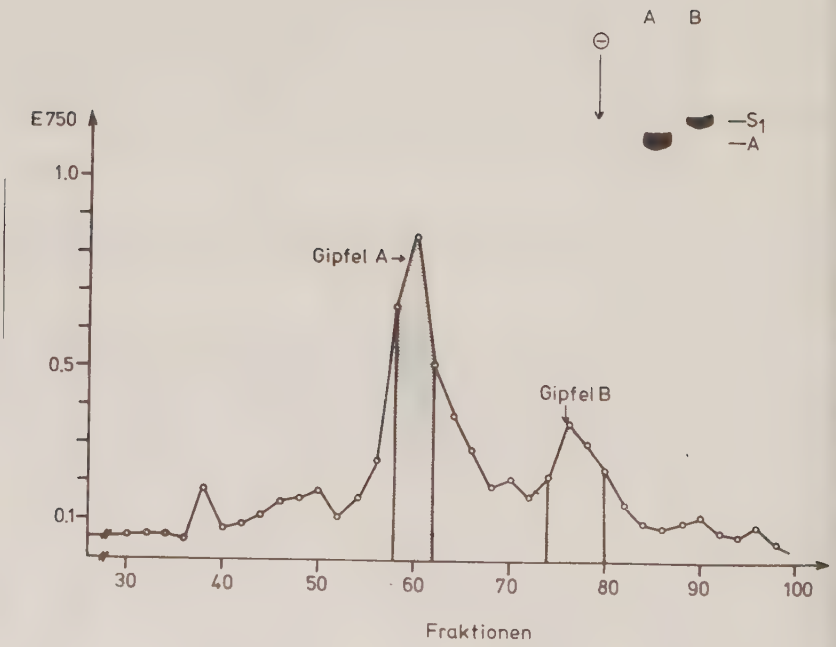


Abb. 30: Trennung des Proteins A von S1 an DEAE-Cellulose (DE 52).
Gipfel A: Protein A;
Gipfel B: Protein S1.

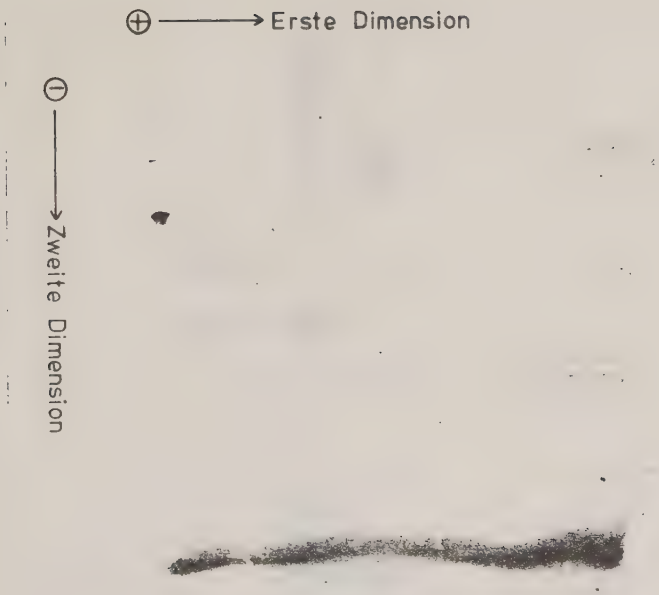


Abb. 31: Zweidimensionale Elektrophorese des isolierten Proteins S1

4.2.2. Fragmentierung des Proteins S1 mit BrCN

Das Protein S1 wurde, wie im Abschnitt 3.2.2. beschrieben, mit BrCN gespalten. Die entstandenen Produkte wurden durch SDS-Elektrophorese analysiert (Abb. 32). Es traten drei Banden auf, die mit "BrCNF1 - BrCNF3" bezeichnet wurden. BrCNF1 war in guter Ausbeute vorhanden, während BrCNF2 und BrCNF3 nur als Spuren zu erkennen waren.

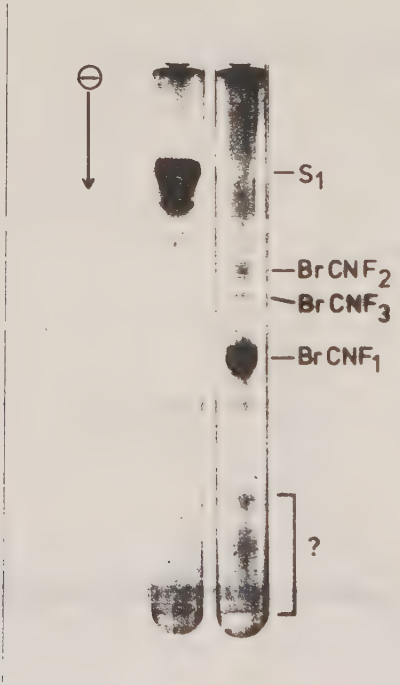


Abb. 32: SDS-Elektrophorese von Protein S1 (links) und der nach BrCN-Behandlung erhaltenen Spaltprodukte (rechts).

4.2.3. Isolierung von BrCNF1 durch Gelfiltration

Die Mischung der Fragmente, die nach BrCN-Behandlung des Proteins S1 entstanden waren, wurde durch Gelfiltration über Sephadex G100 fine (170 x 1 cm) aufgetrennt. Das Elutionsdiagramm ist in Abb. 33 wiedergegeben.

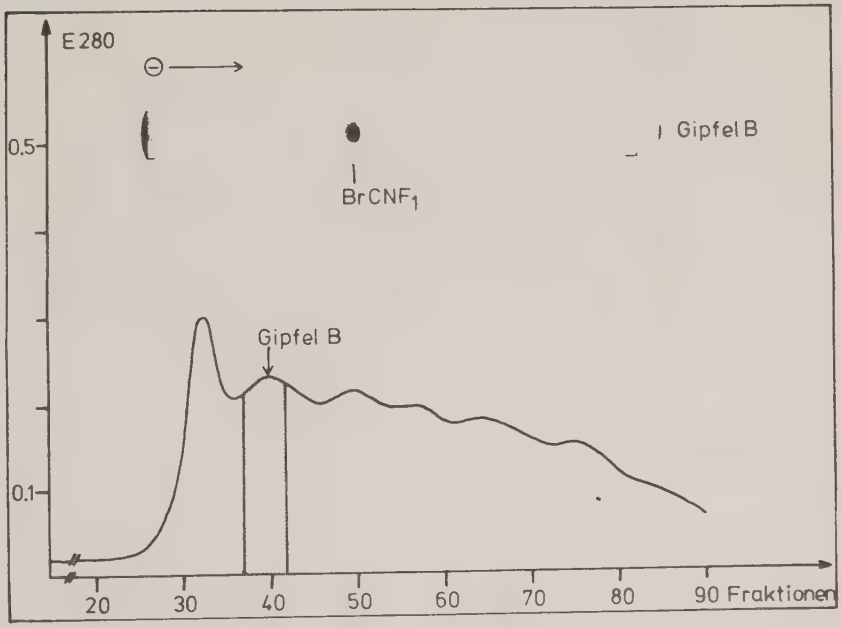


Abb. 33: Trennung der nach der Spaltung des Proteins S1 mit BrCN entstandenen Fragmente über G100 Sephadex (fine).

4.2.4. Charakterisierung von BrCNF1

Zur Charakterisierung von BrCNF1 wurde das Molekulargewicht durch die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese bestimmt. Das Ergebnis ist aus der Abbildung 34 ersichtlich. Daraus geht hervor, daß das Fragment BrCNF1 ein Molekulargewicht von etwa 29.000 hat.

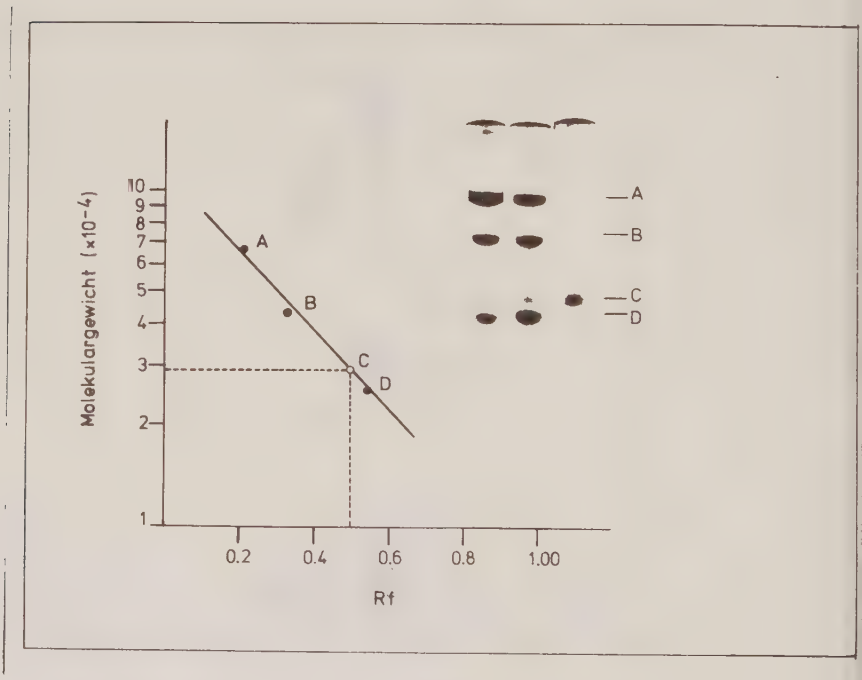


Abb. 34: Molekulargewichtsbestimmung von BrCNF1 durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.
A: Rinderserum-Albumin (MG 68.000)
B: Ovalbumin (MG 43.000)
C: BrCNF1 (MG 29.000)
D: Chymotrypsinogen (MG 25.700)

4.2.4.1. Homogenitätsprüfung an BrCNF1

Zur Prüfung der Frage, ob das Fragment BrCNF1 einheitlich ist oder aus mehreren Komponenten besteht, wurde es auf die zweidimensionale Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetragen. Das Elektrophorogramm ist in Abb. 35 dargestellt.

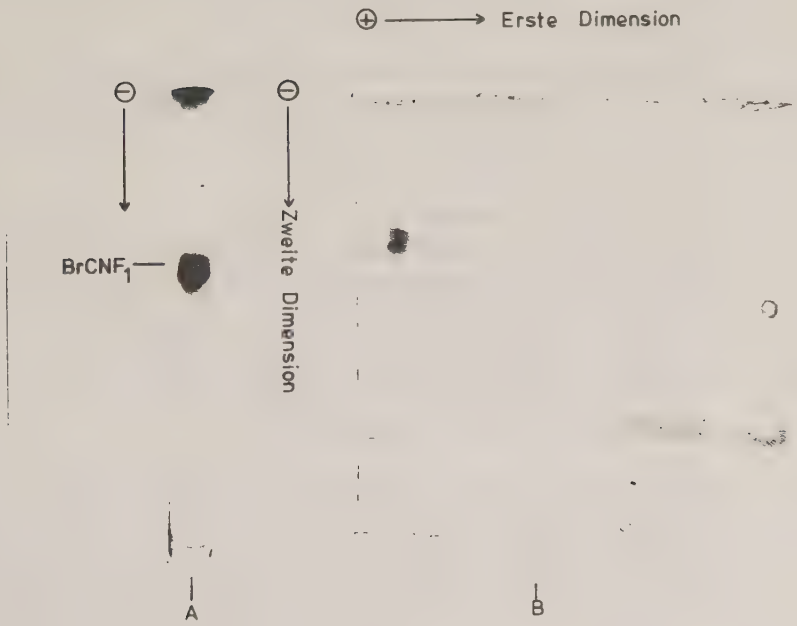


Abb. 35: A: SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von BrCNF1; B: zweidimensionale Elektrophorese von BrCNF1

Aus Abb.35 geht hervor, daß es sich bei BrCNF1 um zwei Bruchstücke handelt, die sich nicht in der Ladung aber in ihrem Molekulargewicht geringfügig unterscheiden.

5. Diskussion

5.1. Sequenzierung des ribosomalen Proteins L15

Bei der Sequenzierung dieses Proteins traten keine besonderen Schwierigkeiten aber folgende Besonderheiten auf:

a) Das tryptische Peptid T23, das nach seiner Aminosäurenzusammensetzung (4 Ile, 1 Phe, 3 Ala, 1 Gly, 1 Asn, 1 Gln, 1 Glu und 1 Lys) sowohl chromatographisch als auch elektrophoretisch wandern sollte, blieb bei der Anfertigung der tryptischen Peptidkarte auf dem Auftragspunkt liegen (s. Abb. 23).

b) Ein SP-Peptid, das nach der Sequenz des Proteins zwischen den Peptiden SP4 und SP5 zu erwarten ist (s. Abb.24), konnte bei der Isolierung der SP-Peptide durch die Sephadex-Säule nicht gefunden werden.

c) Bei der Isolierung der Lysin-blockierten tryptischen Peptide durch die Sephadex-Säule trat das Peptid LBT10 in den ersten drei nacheinander folgenden Gipfeln des Elutionsprofils auf (s. Abb. 19). Dies ist normalerweise auf drei Moleküle unterschiedlicher Größe zurückzuführen. Nähere Analysen dieser drei Gipfel ergaben aber, daß es sich dabei um dieselbe Substanz handelt.

Die drei genannten Punkte lassen sich wahrscheinlich auf dieselbe Ursache zurückführen, nämlich auf die Schwerlöslichkeit des tryptischen Peptids T23. Wegen dieser Eigenschaft blieb T23 auf dem Auftragspunkt liegen (Punkt a). Da T23 ein Teil des nicht gefundenen SP-Peptids ist, war auch dieses Peptid schwer löslich und ging vor oder auf der Sephadex-Säule verloren (Punkt b). Weil T23 auch im Peptid LBT10 enthalten ist, war auch dieses Peptid schlecht löslich und neigte zur Aggregat-Bildung unter den angewendeten Bedingungen (5 % Essigsäure bei der Gelfiltration). Die dadurch entstandenen, LBT10 enthaltenden Aggregate

wurden auf der Sephadex-Säule voneinander getrennt und nacheinander eluiert (Punkt c). Es ist wahrscheinlich, aber nicht bewiesen, daß die genannte Erklärung für alle drei Punkte zutrifft.

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen in der N-terminalen Region des Proteins L15, wie sie mit dem Sequenator bzw. mit den in dieser Arbeit beschriebenen Methoden ermittelt wurden, zeigt eine gute Übereinstimmung. Es ergeben sich allerdings folgende drei Abweichungen: In der Position 12 ist Isoleucin (statt Serin), in Position 32 ist Threonin (statt Glycin) und in Position 43 ist Arginin (statt Glycin) enthalten (Abb. 24).

Das Gesamtmolekulargewicht des Proteins L15 wurde aus der Sequenz errechnet; es beträgt 14.981.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die vollständige Aufklärung der Primärstruktur des ribosomalen Proteins L15 sowie die Isolierung des ribosomalen Proteins S1, die Fragmentierung dieses Proteins mit BrCN und die Isolierung und Charakterisierung von BrCN-Fragmenten.

6.1. Aufklärung der Primärstruktur von L15

Das Protein wurde mit Trypsin (ohne bzw. nach Blockierung der Lysin-Reste) sowie mit Staphylococcus aureus Protease gespalten. Aus der tryptischen Spaltung des Proteins wurden 21 Peptide isoliert (Abb. 12). Die restlichen tryptischen Peptide wurden aus tryptischen Nachspaltungen von Peptiden erhalten, die aus der Spaltung des Proteins mit Staphylococcus aureus Protease (SP-Peptide) und von Lysin-blockierten tryptischen Peptiden (LBT-Peptide) gewonnen wurden (Abb. 14, 15 und 23). Alle SP-Peptide wurden durch Gelfiltration isoliert (Abb. 13). Die Lysin-blockierten tryptischen Peptide konnten durch eine Kombination von Gelfiltration, von Peptidkartentechnik und von Dünnschichtchromatographie in gereinigter Form erhalten werden (Abb. 19, 20, 21 und 22).

Die Sequenzierung der Peptide wurde durch eine verbesserte Mikro-Dansyl-Edman-Methode und die am intakten Protein in einem modifizierten Beckman-Sequenator durchgeführt. Die Zuordnung der tryptischen Peptide erfolgte durch die Isolierung und Sequenzierung der die tryptischen Peptide überlappenden "Brückenpeptide" SP1, SP2, SP4, SP6, SP7 und LBT10 sowie durch die aus der thermolytischen und chymotryptischen Nachspaltung von SP-Peptiden gewonnenen Peptide SP3Th7, SP3Th8 und SP5Ch3 (Abb. 24). Durch die Kombination der Ergebnisse aller sequenzierten Peptide konnte die vollständige Primärstruktur des Proteins L15 ermittelt werden (Abb. 24).

6.2. Isolierung des ribosomalen Proteins S1, Spaltung dieses Proteins mit BrCN sowie Isolierung und Charakterisierung von BrCN-Fragmenten

Für die Reinigung des Proteins S1 wurden nacheinander vier Säulen benutzt: eine DEAE-Cellulose-Säule zur Trennung der basischen von den sauren ribosomalen Proteinen; eine Ultrogel-Säule zur Trennung der hochmolekularen von den niedermolekularen sauren Proteinen; eine DEAE-Cellulose-Säule zur weiteren Auftrennung der hochmolekularen sauren Proteine und schließlich eine Sephadex-Säule zur endgültigen Reinigung des isolierten Proteins S1. Die verschiedenen Säulenchromatographie-Trennungen sind in den Abbildungen 26 bis 31 dargestellt.

Das isolierte Protein S1 wurde durch Behandlung mit BrCN gespalten, und die Mischung der entstandenen Fragmente wurde auf einer Sephadex-Säule aufgetrennt. Das Hauptfragment BrCNF1 hat ein Molekulargewicht von etwa 29.000, wie durch SDS-Elektrophorese ermittelt wurde. Die Analyse dieses Fragments auf der zweidimensionalen Polyacrylamidgel-Elektrophorese zeigte, daß BrCNF1 aus zwei Peptiden besteht, die sich in ihrer Größe geringfügig unterscheiden. Die Isolierung des Fragments ermöglicht seine weitere proteinchemische Analyse.

7. Literaturverzeichnis

Burges, A.W., Ponnuswamy, P.K., Scheraga, H.A.: Analysis of Conformations of Amino Acid Residues and Prediction of Backbone Topography in Proteins.
Israel J.Chem. 12, 239-286 (1974).

Chen, R., Mende, L. und Arfsten, U.: The Primary Structure of Protein L27 from the Peptidyl-tRNA Binding Site of Escherichia coli Ribosomes.
FEBS Lett. 59, 96-99 (1975).

Chen, R.: The Sequence Determination of a Protein in Micro Scale: The Sequence Analysis of Ribosomal Protein L34 of Escherichia coli.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 873-886 (1976).

Chou, P.Y., Fasman, G.D.: Conformational Parameters for Amino Acids in Helical, ß-Sheet, and Random Coil Regions Calculated from Proteins.
Biochemistry 13, 211-222 (1974a).

Chou, P.Y., Fasman, G.D.: Prediction of Protein Conformation.
Biochemistry 13, 222-249 (1974b).

Chou, P.Y., Adler, A.J., Fasman, G.D.: Conformational Prediction and Circular Dichroism Studies on the lac Repressor.
J. Mol. Biol. 96, 29-45 (1975).

Czernilovsky, A.P., Collatz, E.E., Stöffler, G. und Küchler, E.: Proteins at the tRNA Binding Sites of Escherichia coli Ribosomes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 230-234 (1974).

Czernilovsky, A.P., Kurland, C.G., Stöffler, G.: 30S Ribosomal Proteins Associated with the 3'-Terminus of 16S rRNA.
FEBS Lett. 58, 281-284 (1975).

Dahlberg, A.E., Dahlberg, J.E.: Binding of Ribosomal Protein S1 of Escherichia coli to the 3'-end of 16S rRNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2940-2944 (1975).

Dixon, H.B.F. und Perham, R.N.: Reversible Blocking of Amino Groups with Citraconic Anhydride.
Biochem. J. 109, 312-314 (1968).

Dohme, F. und Nierhaus, K.H.: Total Reconstitution and Assembly of 50S Subunits from Escherichia coli Ribosomes in Vitro.
J. Mol. Biol. 107, 585-599 (1976).

Dzionara, M., Robinson, S.M.L., Wittmann-Liebold, B.: Secondary Structures of Proteins from the 30S Subunit of the Escherichia coli Ribosome.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 1003-1019 (1977).

Edman, P.: Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides.
Acta Chem. Scan. 4, 283-293 (1949).

Giri, L. und Subramanian, A.R.: Hydrodynamic Properties of Protein S1 from Escherichia coli Ribosome.
FEBS Lett. 81, 199-203 (1977).

Gray, W.R. und Hartley, B.S.: The Structure of a Chymotryptic Peptide from Pseudomonas cytochrome C-551.
Biochem. J. 89, 379-380 (1963).

Gross, E. und Witkop, B.: Selective Cleavage of the Methionyl Peptide Bonds in Ribonuclease with Cyanogen Bromide.
J.Am. Chem. Soc. 83, 1510 (1961)

Hamel, E., Koka, M. und Nakamoto, T. Requirement of an Escherichia coli 50S Ribosomal Protein Component for Effective Interaction of the Ribosome with T and G Factors and with Guanosine Triphosphate.
J. Biol. Chem. 247, 805-814 (1972).

Hill, W.E., Rosetti, G.P. und van Holde, K.E.: Physical Studies of Ribosomes from Escherichia coli.
J. Mol. Biol. 44, 263-277 (1969).

Hindennach, I., Kaltschmidt, E. und Wittmann, H.G.: Isolation of Proteins from 50S Ribosomal Subunits of Escherichia coli.
Eur. J. Biochem. 23, 12-16 (1971).

Hirs, C.H.W.: The Oxidation of Ribonuclease with Performic Acid.
J. Biol. Chem. 219, 611-621 (1956).

Houmard, J. und Drapeau, G.R.: Staphylococcal Protease: A Proteolytic Enzyme Specific for Glutamoyl Bonds.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 3506-3509 (1972).

Kaltschmidt, E. und Wittmann, H.G.: Ribosomal Proteins, XII. Number of Proteins in Small and Large Ribosomal Subunits of Escherichia coli as Determined by Two-Dimensional Gel Electrophoresis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 1276-1282 (1970).

Kaltschmidt, E. und Wittmann, H.G.: Ribosomal Proteins, VII,1. Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis for Fingerprinting of Ribosomal Proteins. Analyt. Biochem. 36, 401-412 (1970).

Kenner, R.A.: A Protein Nucleic Acid Crosslink in 30S Ribosomes.
Biochem. Biophys. Commun. 51, 932-938 (1973).

Krol, A., Branlant, C., Ebel, J.P., Visentin, L.P.: Recognition of RNA by Ribosomal Protein S1: Interaction of S1 with 23S rRNA of Escherichia coli.
FEBS Lett. 80, 255-260 (1977).

Littlechild, J., Dijk, J. und Garrett, R.: The Identification of New RNA-Binding Proteins in the Escherichia coli Ribosome.
FEBS Lett. 74, 292-294 (1977).

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J.: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951).

Nagano, K.: Triplet Information in Helix Prediction Applied to the Analysis of Super-secondary Structures.
J. Mol. Biol. 109, 251-274 (1977).

Nierhaus, K.H. und Weber, J.: Struktur und Funktion der Ribosomen.
Umschau 72, 346-352 (1972).

Robson, B. und Suzuki, E.: Conformational Properties of Amino Acid Residues in Globular Proteins.
J. Mol. Biol. 107, 327-356 (1976).

Sobura, J.E., Choudhury, M.R., Hawley, D.A., Wahba, A.J.: Requirement of Chain Initiation Factor 3 and Ribosomal Protein S1 in Translation of Synthetic and Natural Messenger RNA.
Nucl. Acid. Res. 4, 19-29 (1977).

Spies, J.R. und Chambers, D.C.: Chemical Determination of Tryptophan in Proteins.
Anal. Chem. 21, 1249 (1949).

Subramanian, A.R.: Sensitive Separation Procedure for Escherichia coli Ribosomal Proteins and the Resolution of High-Molecular-Weight Components.
Eur. J. Biochem. 45, 541-546 (1974).

Szer, W., Hermoso, J.M., Leffler, S.: Ribosomal Protein S1 and Polypeptide Chain Initiation in Bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2325-2329 (1975).

Tabone, J., Robert, D., Thomassey, S. und Mamounas, N.: Bull. Soc. Chim. Biol. 32, 529 (1950)

Teraoka, H. und Nierhaus, K.H.: Das Antibiotikum Erythromycin stoppt Ribosomen-Aktivität. Umschau 11, 347-348 (1977).

Tischendorf, G., Zeichhardt, H. und Stöffler, G.: Architecture of the Escherichia coli Ribosome as Determined by Immune Electron Microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 4820-4824 (1975).

Traub, P. und Nomura, M.: Structure and Function of E.coli Ribosomes, V. Reconstitution of Functionally Active 30S Ribosomal Particles from RNA and Proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59, 777-784 (1968).

Van Dieijen, G., van der Laken, C.J., van Knippenberg, P.H. und van Duin, J.: Function of Escherichia coli Ribosomal Protein S1 in Translation of Natural and Synthetic Messenger RNA. J. Mol. Biol. 93, 351-366 (1975).

Van Dieijen, G., van Knippenberg, P.H. und van Duin, J.: The Specific Role of Ribosomal Protein S1 in the Recognition of Native Phage RNA. Eur. J. Biochem. 64, 511-518 (1976).

Weber, K. und Osborn, M.: The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406-4412 (1969).

Wittmann-Liebold, B., Geissler, A.W. und Marzinzig, E.: Studies on the Primary Structure of 14 Proteins from the Large Subunit of Escherichia coli Ribosomes with an Improved Protein Sequenator and with Mass Spectrometry. J. Supramol. Struct. 3, 426-447 (1975).

Wittmann-Liebold, B. und Dzionara, M.: Studies on the Significance of Sequence Homologies Among Proteins from Escherichia coli Ribosomes. FEBS Lett. 65, 281-283 (1976).

8. Anmerkungen

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde vom November 1975 bis Dezember 1977 am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin-Dahlem angefertigt.

Ich danke Herrn Professor Dr. H.G. Wittmann für die Unterstützung bei der vorliegenden Arbeit.

Den Herren Doktoren R. Chen und A.R. Subramanian danke ich für die Einführung in die Methoden und für wertvolle Ratschläge während der Arbeit.

Lebenslauf

Name, Vorname:	Giorginis, Sotirios
geb. am:	21. Januar 1945
in:	N.Skopos / Serres / Griechenland
Eltern:	Athanasios D. Giorginis, Landwirt Chrisoula Giorginis geb. Koumaroglou
Schulausbildung:	Volksschule in N.Skopos ab Herbst 1951 A'Gymnasium für Knaben in Serres ab Herbst 1957 Abitur (Aufnahmeprüfung zum Studium): Herbst 1964
Studium:	Biologie und Geologie an der Aristoteles-Universität, Thessaloniki ab Studienjahr 1964/65 Diplomprüfung: Dezember 1970
Militärzeit:	Januar 1971 - Februar 1973
Studium:	Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München (Sommersemester 1974 bis Sommersemester 1975)
Doktorarbeit:	seit November 1975 Anfertigung der Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Abt. Wittmann, in Berlin-Dahlem